UNTERSUCHUNGEN ZUR CHROMOSOMALEN DNS-VERDOPPLUNG IN DROSOPHILA

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

MANFRED STEINEMANN

aus Heubach

1979

UNTERSUCHUNGEN ZUR CHROMOSOMALEN DNS-VERDOPPLUNG IN DROSOPHILA

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

MANFRED STEINEMANN

aus Heubach

1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 31. Mai 1979

Dekan: Professor Dr. F. Oberwinkler

1. Berichterstatter: Professor Dr. W. Beermann

2. Berichterstatter: Professor Dr. W. Seyffert

Gesamtherstellung: **aku** - Fotodruck GmbH, 8600 Bamberg

Herrn Professor Dr. W. BEERMANN danke ich für sein Interesse und seine Unterstützung.

Herrn Professor Dr. H.G. CALLAN, F.R.S. und Dr. D. MALCOLM möchte ich für ihre freundliche Gastfreundschaft während meines Studienaufenthaltes im Department of Zoology, Universität St. Andrews, danken. Viele methodische Anregungen verdanke ich Dr. P.P. RAE, jetzt Yale Universität, New Haven. Für die statistische Beratung bei der Aufarbeitung der Ergebnisse bin ich Herrn Dr. R. LORENZ sehr zu Dank verpflichtet. Herrn Prof. Dr. M.F. RAJEWSKY, Institut für Zellbiologie, Universität Essen und Dr. G.G. STEEL, Institute of Cancer Research, London danke ich für ihre Hilfe bei der Auswertung der "Markierten-Mitose" Daten.

Für die sorgfältige Anfertigung der Zeichnungen und die Fertigstellung des Manuskriptes möchte ich Herrn FREIBERG, Frau DARENBERG und Frau ENTIAN danken. Bedanken möchte ich mich für die gute Mitarbeit von Frau STUTZ.

Dank schulde ich Frau SPRINGMANN, die mich mit ihrem photographischen Können bei vielen Abbildungen unterstützt hat.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548928_0001

I N H A L T

		Seite
I.	EINLEITUNG	1
II.	MATERIAL UND METHODEN	5
	1. Biologisches Versuchsmaterial	5
	1.1. Versuchstiere	5
	1.2. Organe-Präparation	5
	2. Medien	8
	3. Cytologie	9
	3.1. Vorbereitung der Objektträger und Deckgläser	9
	3.2. Gehirn-Präparate	10
	3.3. Speicheldrüsen-Präparate	10
	3.4. Färbungen	11
	3.5. Chromosomale Autoradiographie	11
	3.6. Photographie	12
	4. DNS-Fadenautoradiographie	12
	5. Bestimmung der DNS-Menge pro Gehirn, bzw. Speicheldrüsenpaar in D.virilis	16
	6. DNS-Markierung	18
	6.1. Markierung von Speicheldrüsen und Gehirnen mit ^{3}H-dThd	18
	6.2. ^{3}H-dThd-Markierung und Fraktionierung der Gehirne- und Speicheldrüsen-DNS in Gleichgewichts-Dichtegradienten	19
	6.3. Substitution von Thymidin in der Speicheldrüsen-DNS durch 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdUrd)	20
	7. DNS•DNS in situ-Renaturierung	20
	8. Markierungsindex (M.I.) und "Markierte-Mitosen-Technik"	21

Seite

9. Sonstige Materialien 22

III. ERGEBNISSE 23

1. Der Karyotyp von D.virilis und seine Besonderheiten 23

2. ^{3}H-dThd-Markierung larvaler Drosophila Gehirne und Speicheldrüsen in vitro in einem Organkulturmedium 27

2.1. Versuche zum ^{3}H-dThd-Einbau 27

2.2. Dichteverteilung der neusynthetisierten D.virilis DNS in präparativen CsCl Gleichgewichts-Dichtegradienten 30

2.3. ^{3}H-dThd-in vitro-Einbau ist Folge semikonservativer DNS-Replikation in den untersuchten Organen 34

3. DNS•DNS in situ-Renaturierung 41

4. DNS-Verdopplung in diploiden und polytänen Kernen von D.virilis nach ^{3}H-dThd-Pulsmarkierung 50

4.1. Markierungseigenschaften der vorwiegend diploiden Zellen larvaler D.virilis Gehirne 50

4.1.1. Cytologische Analyse von Interphasekernen nach ^{3}H-dThd-Pulsmarkierung 51

4.1.2. Markierungsindex (M.I.) nach ^{3}H-dThd-Pulsmarkierung 53

4.1.3. Cytologische Analyse mitotischer Chromosomen nach ^{3}H-dThd-Pulsmarkierung 57

4.1.4. S-Phasenlänge einer proliferierenden Zellpopulation in D.virilis Gehirnen 59

4.1.5. Markierungsverteilung über den Metaphasechromosomen nach ^{3}H-dThd-Pulsmarkierung korreliert mit dem zeitlichen Eintritt in die Mitose 63

4.2. Markierungseigenschaften der Riesenchromosomen in den larvalen Speicheldrüsen von D.virilis 66

Seite

5. Gliederung und Ablauf der DNS-Verdopplung in D.virilis Gehirnen und Speicheldrüsen 72

5.1. DNS-Fadenautoradiogramme von Gehirnlysaten 73

5.1.1. Richtung der Replikation 73

5.1.2. Replikationsrate der Wachstumspunkte 75

5.1.3. Länge der Replicons 79

5.1.4. Topographie der Replicons 86

5.1.5. Initiationsabfolge der Replicon-origins 96

5.1.6. Termination der Replicons 100

5.2. DNS-Fadenautoradiogramme von Speicheldrüsenlysaten 105

5.2.1. Replikationsrate der Wachstums-Punkte 105

5.2.2. Länge der Replicons 110

5.2.3. Topographie der Replicons 116

5.2.4. Initiationsabfolge der Replicon-origins 117

5.3. Gegenüberstellung der Ergebnisse der DNS-Fadenautoradiographien aus beiden D.virilis Organen: Gehirne und Speicheldrüsen 119

5.3.1. Replikationsraten der Wachstumspunkte 119

5.3.2. Länge und Topographie der Replicons 121

IV. DISKUSSION 126

V. ZUSAMMENFASSUNG 153

VI. LITERATUR 157

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN 167

LEBENSLAUF

I. EINLEITUNG

Chromosomen sind stoffliches Äquivalent eukaryotischer Kopplungsgruppen. Untersuchungen in Drosophila (KAVENOFF und ZIMM, 1973; KAVENOFF ET AL., 1974) und in Hefe (PETES und FANGMAN, 1972; BLAMIRE ET AL., 1972) legen nahe, daß die DNS eines Eukaryoten-Chromosoms als ein langes doppelsträngiges Fadenmolekül vorliegt. Wie die klassischen Arbeiten der Genetik und Cytologie es für das Eukaryoten-Chromosom gesichert haben, ist demzufolge das DNS-Fadenmolekül durch eine definierte lineare Anordnung der Gene längsgegliedert. Anhaltspunkte einer weiteren Längsgliederung des eukaryotischen DNS-Fadenmoleküls für die identische Verdopplung ergaben Befunde von CAIRNS (1966) und HUBERMAN und RIGGS (1968) mit DNS-Fadenautoradiographien. Sie konnten zeigen, daß mehrere hundert Mikrometer lange DNS-Fäden von mehr als einer Replikationseinheit, Replicons (JACOB und BRENNER, 1963), verdoppelt werden; d.h. Eukaryoten-Chromosomen sind in viele Replicons gegliedert, während das gesamte Bakterien- oder Phagenchromosom jeweils einem einzigen Replicon entspricht.

Ein Eukaryoten-Replicon umfaßt einen Replikationsursprung (Origin), von dem sich, bidirektionale Replikation vorausgesetzt, zwei Replikationsabschnitte mit gabelähnlichen Wachstumspunkten in entgegengesetzter Richtung voneinander wegbewegen. Der Terminationsort (Terminus) der Replikationsabschnitte ist unklar (Übersichtsartikel s. EDENBERG und HUBERMAN, 1975). Der Zeitraum, den ein Eukaryoten-Chromosom zu seiner identischen Verdopplung benötigt, wird bestimmt durch das Zusammenwirken dreier Bedingungen: a) Größe der Wachstumrate der Replikationsgabeln, b) Länge der individuellen Replicons, c) zeitliche Abfolge der Initiation aller Replicons eines Chromosoms. Beginn und Ende einer Verdopplung des Chromosomenkomplements, die S-Phasenlänge, ergibt sich aus der Überlagerung der chromosomalen Einzelereignisse.

Vor Anwendung der DNS-Fadenautoradiographie-Technik auf eukaryotische Zellen (CAIRNS, 1966) ließen Autoradiographien ^{3}H-dThd pulsmarkierter mitotischer Chromosomen (TAYLOR, 1960; LIMA-de-FARIA, 1961; STUBBLEFIELD und MUELLER, 1962) erkennen, daß bei der Verdopplung des Eukaryoten-Chromosoms mehr als ein Replikationsursprung (Origin) aktiv sein müsse. Die Größe der mitotischen Metaphase-Chromosomen begrenzte jedoch stark die Auflösung distinkter Markierungen. Riesenchromosomen erwiesen sich dagegen als ideale Versuchsobjekte für Feinanalysen von Verteilung und zeitlichem Ablauf der intrachromosomalen DNS-Verdopplungsmuster (PLAUT, 1963; KEYL und PELLING, 1963; GABRUSEWYCZ-GARCIA, 1964; Übersichtsartikel s. RUDKIN, 1972). So zeigen die Riesenchromosomen neben einem kontinuierlichen Markierungsmuster diskontinuierliche Muster, die sich einzelnen Banden bzw. Bandengruppen zuordnen lassen. Die Tatsache, daß Banden bzw. Bandengruppen isoliert replizieren, führte zur Formulierung einer Arbeitshypothese, welche vorschlägt, in Anlehnung an die "eine-Bande (oder Bande plus Interbande) -eine-genetische-Einheit" Hypothese (Übersichtsartikel s. BEERMANN, 1972), die Bande als eine polytäne Replikationseinheit (PELLING, 1966) aufzufassen.

Heterochromatische Chromosomenstrukturen, bzw. auch ganze Chromosomen (z.B. Geschlechtschromosomen), zeigen gleichfalls einen zeitlich eigenständigen Verdopplungsrhythmus. Dieses Verhalten wurde von LIMA-de-FARIA (1959) erstmalig für die Geschlechtschromosomen einer Heuschreckenart (Melanoplus differentialis) beschrieben. Abweichendes Replikationsverhalten fanden auch KEYL und PELLING (1963) für die heterochromatischen Querscheiben von C.th.thummi. Sie interpretieren den isolierten lokalen ^{3}H-dThd-Einbau durch die Annahme einer längeren Zeitspanne, welche die heterochromatischen Banden zur Beendigung ihrer Verdopplung benötigen.

Die vorliegende Arbeit versucht, durch Anwendung der DNS-Fadenautoradiographie-Technik auf mitotische Chromosomen und Riesenchromosomen, topographische Befunde entlang eines

mehrere hundert Mikrometer langen DNS-Fadenmoleküls mit Beobachtungen auf der komplexen Strukturebene von Chromosomen zu verknüpfen. Dabei stand die Möglichkeit eines Vergleichs von polytänen und nicht polytänen (mitotischen) Chromosomen desselben Organismus im Vordergrund.

Ungefähr die Hälfte des diploiden Drosophila virilis Komplements besteht aus Heterochromatin. Das von HEITZ (1934) α-Heterochromatin benannte Heterochromatin "wächst", wie von ihm schon beobachtet, nicht im selben Umfang bei der Polytänisierung des Speicheldrüsenkomplements mit, wie eine mit β-Heterochromatin bezeichnete Heterochromatinfraktion und das Euchromatin; es wird unterrepliziert. Wie durch in situ-Hybridisierung gezeigt wurde (GALL ET AL., 1971; STEINEMANN, 1976; und s.III.3), enthält das α-Heterochromatin alle drei dA•dT-reichen Satellitenfraktionen, die durch CsCl Gleichgewichts-Dichtegradientenzentrifugation von der Hauptbanden-DNS abgetrennt werden können. Die Satellitenfraktionen umfassen ungefähr 45% der Gesamt-DNS, sind hochrepetitiv und gehören dem "simple sequence" DNS-Typ an (GALL und ATHERTON, 1974).

Von der zweiten larvalen Häutung bis zu dem Vorpuppen-Stadium benötigt eine D. melanogaster Larve bei 25°C ungefähr 48 Stunden (BODENSTEIN, 1950). Innerhalb dieser Zeitspanne durchlaufen die Riesenchromosomen der Speicheldrüsen einen oder zwei Verdopplungszyklen (RUDKIN, 1972; s. dort ABB. 2). Eine Bestimmung der S-Phasenlänge der hochpolytänen Speicheldrüsenzellen liegt noch nicht vor. Nimmt man jedoch einen Verdopplungsschritt für die 48 Stdn. vor dem Vorpuppenstadium an, so ist es vernünftig, auch von einer relativ langen S-Phasenlänge auszugehen. Für mitotische Zellen gibt es dagegen mehrere Verfahren zur Bestimmung der S-Phasenlänge. Die S-Phasenlänge einer proliferierenden Zellpopulation in D. virilis Gehirnen wurde mit der "Markierten-Mitose-Technik" (QUASTLER und SHERMAN, 1959) bestimmt. Sie betrug 11,9 Stdn.. Ungefähr die letzten 3 Stdn. der S-Phase entfallen auf die ausschließliche Verdopplung des α-Heterochromatins. Das Euchromatin benötigt für seine Verdopplung ungefähr 9 Stdn.;

das α-Heterochromatin 11 Stdn. . Wie auch in dieser Arbeit gezeigt wird, gibt es keine experimentellen Anhaltspunkte für ein Mitreplizieren des α-Heterochromatins im Verlauf der Polytänisierung.

Die hochpolytänen Zellen der Speicheldrüsen des 3. Larvenstadiums benötigen offensichtlich eine längere Zeitspanne zur Verdopplung ihres polytänen Chromosomen-Komplements als der euchromatische Abschnitt des mitotischen Chromosomen-Komplements von Gehirnzellen. Welche der oben genannten Eigenschaften - Wachstumsrate, Repliconlängen oder Initiationsabfolge - Ursache der S-Phasenverlängerung ist, war eine der Fragestellungen der vorgelegten Arbeit.

Mit Chromosomen-Autoradiographien wurde das zeitliche Replikationsverhalten des α-Heterochromatins im mitotischen Chromosomen-Komplement untersucht. Die Verdopplung des β-Heterochromatins der Riesenchromosomen interessierte vor allem zur Charakterisierung der Musterabfolge (HÄGELE, 1973).

Es wurde der Versuch unternommen, durch Anwendung der DNS-Fadenautoradiographie auf beide Organe, die Eigenschaften - Wachstumsrate, Repliconlängen und Initiationsabfolge - der Replicons in beiden Organen näher zu charakterisieren. In Verbindung mit den chromosomalen Markierungsmustern wird eine Arbeitshypothese der Chromosomenverdopplung entwickelt.

Ein Teil der Ergebnisse wurde bereits veröffentlicht (STEINEMANN, 1976, 1978).

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Biologisches Versuchsmaterial

1.1. Versuchstiere

Als Versuchstiere fanden die Drosophila Arten D. virilis, D. melanogaster und D. miranda Verwendung; vor allem jedoch D. virilis. Die Tiere wurden in Plastikflaschen auf dem üblichen Drosophila Nährbei - Sirup, Malz, Mais, Sojamehl, Agar und Trockenhefe (Cenovis, Radolfzell) - gezüchtet. Frische Hefe wurde nicht verwendet. Das Nährmedium wurde mit Propionsäure (4,5 ml auf 1000 ml H_2O) und Nipagin (5 g auf 1000 ml H_2O) versetzt. Die Aufzucht erfolgte im Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 Stdn. bei 18°C.

1.2. Organe-Präparation

Larven des 3. Larvenstadiums wurden aus den Zuchtflaschen entnommen und in einem Glasblockschälchen in Medium A (s.u.) gesammelt. Für die Präparation wurden die Larven einzeln entnommen. Präpariert wurde mit Uhrmacherpinzetten (Tanic, 5) in einer 3001 (35 x 10 mm) Gewebekultur-Petri-Schale der Firma Falcon (Oxnard, Kalifornien) unter einem Binokular der Firma Leitz (Wetzlar). Nach dem Aufreißen des Integuments lassen sich Speicheldrüsenpaar und Gehirn leicht entfernen. Im allgemeinen wurden bei den Versuchen mit Speicheldrüsen jeweils Paare verwendet. Der unterschiedlich stark anhaftende Fettkörper wurde sorgfältig abpräpariert, bzw. die Fettkörperzellen mechanisch mit der Pinzette zerstört. ABB. 1 zeigt eine Raster-Elektronenmikroskopische (REM) Aufnahme eines D. virilis Speicheldrüsenpaars. Mit etwas Übung lassen sich ungefähr 30 Speicheldrüsenpaare pro Stunde sauber präparieren. Eine willkürliche Auswahl an Gehirnen zeigen die REM-Aufnahmen in ABB. 2. Vorbereitung der Gewebe und REM-Aufnahmen wurden freundlicherweise von M.

ABB.1

Legende zu ABB. 1:

Raster-Elektronenmikroskopische Aufnahme eines larvalen Speicheldrüsenpaars von D.virilis (3. Larvenstadium). Beide Drüsen zeigen noch Reste von unvollständig entfertem Fettkörper. Um eine größere Haftung des Organs an der Unterlage zu erreichen, wurden die Reste des zerstörten Fettkörpers und andere kontaminierende Gewebeteile nicht vollständig entfernt. Die Ausführungsgänge der beiden Drüsen vereinigen sich zu einem gemeinsamen Ausführungsgang, der in den Pharynx mündet. Aufnahme M. CLAVIEZ. Maßstab 0,1 mm.

A., Anlage-Zellen.

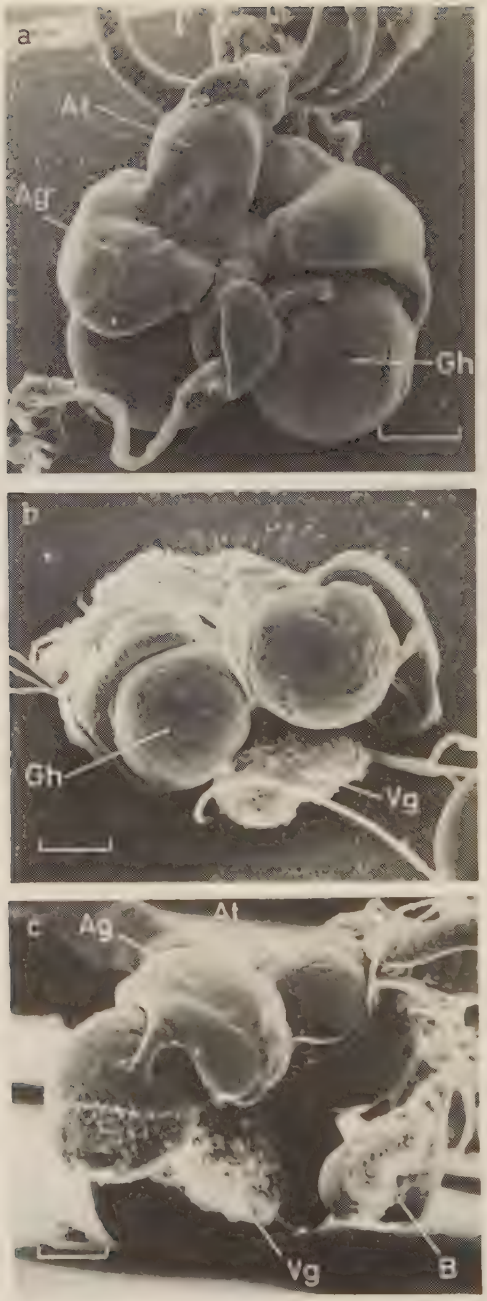


ABB.2

Legende zu ABB. 2:

Raster-Elektronenmikroskopische Aufnahmen von D.virilis Gehirnen (3. Larvenstadium) aus einer Gehirne-Präparationsserie. Um eine bessere Haftung auf der Unterlage zu erhalten, wurden hier kontaminierende Gewebsteile nicht entfernt, im Gegensatz zu den für die Inkubationsversuche verwendeten Gehirne. Wie aus den Aufnahmen ersichtlich, geht bei der raschen Präparation der Gehirne meistens das Ventralganglion ganz (a) oder teilweise (b), (c) verloren. Der als "Gehirn" bezeichnete Organkomplex umfaßt meistens beide Gehirnhemisphären, beide Augen- und Antennen-Imaginalscheiben, vermutlich die Ringdrüse, Teile des Ventralganglions und eine wechselnde Anzahl anderer Imaginalscheiben, z.B. Bein-Imaginalscheibe.
Aufnahme M. CLAVIEZ. Maßstab in (a), (b) und (c) 0,1 mm.

At., Antennen-Imaginalscheibe; Ag., Augen-Imaginal-Scheibe; B., Bein-Imaginal-Scheibe; Gh., Gehirnhemisphäre; Vg., Ventralganglion (Teil).

Claviez durchgeführt (s.a. CLAVIEZ, M., 1976). Als Gehirn (s. a. Legende ABB. 2) wird in dieser Arbeit ein Organkomplex bezeichnet, der folgende Organe umfaßt: Beide Gehirnhemisphären, beide Augen- und Antennen-Imaginalscheiben; vermutlich die Ringdrüse, Teile des Ventralganglions und eine wechselnde Anzahl anderer Imaginalscheiben (z.B. Bein-Imaginalscheibe).

Beide Organe, Speicheldrüsenpaare bzw. Gehirne, wurden in einem 100 µl Tropfen des Mediums A (s.u.) in einer 3001 Falcon Petri-Schale gesammelt.

2. Medien

Medium A (s.a. STEINEMANN, 1976) ist eine Modifikation von COHENS G Medium (COHEN und GOTCHEL, 1971). Es enthält: 25 mM Natrium-β-glycerophosphat, 10 mM $MgCl_2$, 30 mM KCl, 3 mM $CaCl_2$, 25 mM Piperazin-N, N'-bis (2-Äthansulfonsäure), 162 mM Saccharose, 50 U/ml Penizillin, Kaliumsalz (B grade), 50 µg/ml Streptomycin (B grade) pH 6,8. 2 x Medium A bedeutet zweifach konzentriertes Medium A.

Inkubations-Medium B hat die Basiszusammensetzung: 60 µl 2 x Medium A, 20 µl ATP (0,126 mg/ml) 20 µl Uridin (25 µg/ml) und 20 µl FdUrd (1 µg/ml). Das Basismedium B wurde für die Versuchsprotokolle heißer Puls, warmer Puls, kalter Puls, Dichteänderung (BrdUrd/^{3}H-dThd-Markierung) und ^{3}H-dThd-Markierung (für die präparativen Gleichgewichts-Dichtegradienten) jeweils um die entsprechenden Komponenten erweitert. Die einstündige Vorinkubation im Versuchsprotokoll der DNS-Fadenautoradiographien erfolgte in Medium B der Basiszusammensetzung (Gesamtvolumen 120 µl). Für die Versuchsprotokolle heißer Puls und ^{3}H-dThd-Markierung (für die präparativen Gleichgewichts-Dichtegradienten) wurde B ergänzt durch 20 µl 2 x Medium A und 20 µl ^{3}H-dThd unterschiedlicher spezifischer Aktivitäten (Einzelheiten s. jeweilige Legende). Im Versuchsprotokoll kalter Puls wurde Medium B erweitert durch 20 µl 2 x Medium A und 20 µl dThd (48,4 µg/ml). Dem Basismedium B wurden im Versuchsprotokoll warmer Puls 20 µl

2 x Medium A und 20 µl ^{3}H-dThd (9 Ci/mmol[1], 1,8 x 10^{-5}M) hinzugefügt. Für das Dichteänderungsprotokoll wurde das Basismedium B erweitert um 20 µl 2 x Medium A und 20 µl der BrdUrd/^{3}H-dThd (9,3 x 10^{-5}M[2]) Mischung. In 160 µl Inkubationsvolumen betrug die BrdUrd Konzentration 1 x 10^{-5}M.

Lysemedium L (s.a. STEINEMANN, 1976, 1978) enthält 60 mM 3-mercapto-1,2-propandiol, 50 mM Dithiothreitol (DTT, A grade), 50 mM Tris, 200 mM EDTA, 1% Sarkosyl, pH 8,4. Vor Gebrauch wurde das Lysemedium mit Proteinase K (in 0,1 x SSC gelöst und 2 Stunden bei 37°C vorverdaut) auf 4 mg/ml gebracht.

Die empirisch gefundenen Medien entsprachen den erwarteten Anforderungen. Es wurden keine weiteren Anstrengungen unternommen, die Medien systematisch zu optimieren.

3. Cytologie

3.1. Vorbereitung der Objektträger und Deckgläser

Objektträger, 76 x 26 mm (Menzel-Gläser), übernacht in 1 N HCl inkubiert und anschließend gründlich mit Ionenaustauscherwasser und Aqua dest. gewaschen, wurden mit einer Gelatine-Chromalaun-Lösung, 0,1% Gelatine (Photogelatine No. 7546) und 0,01% Chromalaun ($KCr(SO_4)_2$ x 12 H_2O) überzogen und staubfrei getrocknet. Für die DNS-Fadenautoradiographie fanden neben

---

[1] Um deutliche Unterschiede in der Silberkörnchendichte zu erhalten, sollte nach HUBERMAN und TSAI (1973) zwischen heißem Puls und warmem Puls mindestens ein dreifacher Unterschied in der jeweiligen spezifischen Aktivität bestehen. Die spezifische Aktivität des warmen Pulses (9 Ci/mmol), der in dieser Arbeit eingesetzt wurde, war ungefähr 1/6 der des heißen Pulses (55 Ci/mmol). Gleiche Volumina von ^{3}H-dThd (55 Ci/mmol, 1,8 x 10^{-5}M) und unmarkiertem dThd (9,1 x 10^{-5}M) wurden gemischt und auf 1,8 x 10^{-5}M rückverdünnt.

[2] BrdUrd (A grade) und ^{3}H-dThd (55 Ci/mmol) wurden für das Dichteänderungsexperiment im molaren Verhältnis 9:1 gemischt (gleiche Volumina ^{3}H-dThd (55 Ci/mmol, 1,85 x 10^{-5}M) und unmarkiertes BrdUrd (16,7 x 10^{-5}M)).

den Gelatine-Chromalaun-Objektträgern auch Objektträger Verwendung, die mit einer Poly-L-Lysin (P1886) Lösung (1 mg/ml) beschichtet und luftgetrocknet wurden.

Deckgläser (Menzel-Gläser), 22 x 22 mm, wurden zur Anfertigung von Speicheldrüsen-Quetschpräparaten mit 1% Siliclad-Lösung silikonisiert. Für die DNS · DNS in situ-Renaturierung wurden unbehandelte 24 x 32 mm Deckgläser (Menzel-Gläser) verwendet.

3.2. Gehirn-Präparate

Gehirne, in Drosophila Ringer[1] präpariert, wurden für 8 Minuten in einer hypotonischen tri-Natriumcitrat-2-hydrat-Lösung (0,95%)vorgequollen. Die vorgequollenen Gehirne wurden dann 20 Sekunden in Alkohol/Eisessig (3:1) fixiert und anschliepend durch 4minütige Inkubation in 45% Essigsäure erneut gequollen. Jeweils ein Gehirn wurde auf einen Gelatine-Chromalaun-Objektträger transferiert und unter einem 22 x 22 mm Deckglas durch kräftigen Daumendruck (senkrecht von oben drücken) gequetscht. Nach Vereisung der Objektträger auf CO_2-Schnee, wurden die Deckgläser mit einer Rasierklinge abgesprengt und die Objektträger unmittelbar in 95% Äthanol überführt. Die Präparate wurden übernacht in 95% Äthanol im Kühlschrank aufbewahrt und luftgetrocknet.

3.3. Speicheldrüsenpräparate

Für Speicheldrüsenpräparate wurden Larven des späten 3. Larvenstadiums verwendet. Die Herstellung der Quetschpräparate folgte der Vorschrift von ATHERTON und GALL (1972). Sie war der Daumenquetschmethode für die Herstellung qualitativ ausgezeichneter Präparate überlegen, sowohl für gewöhnliche Autoradio-

---

[1] Zusammensetzung der verwendeten Drosophila Ringerlösung: 5,55 g NaCl, 0,22 g KCl, 0,44 g $CaCl_2$ auf 1000 ml Aqua dest. auffüllen.

graphien polytäner Kerne nach ^{3}H-dThd-Markierung als auch für die einer Vorbehandlung unterzogenen Speicheldrüsenpräparate der in situ-Hybridisierung. Das "Trommeln" mit dem Radiergummiende eines Bleistiftes verlangte etwas Übung und mußte auf die jeweilige Drosophila Art eingestellt werden. Für die in situ-Hybridisierung waren jeweils 10% einer Präparateserie tauglich. Die Vorbehandlung der Präparate für die in situ-DNS · DNS-Renaturierung erfolgte nach PARDUE und GALL (1975).

3.4. Färbungen

Gehirne- sowie Speicheldrüsenautoradiographien wurden mit phosphatgepufferter Giemsa-Lösung, pH 6,8 gefärbt. Die Giemsa-Stammlösung wurde nach LILLIE (1965) angesetzt. In 100 ml einer Mischung gleicher Volumina von Glyzerin und Methanol wurden 0,8 g Giemsa (Azurgemisch) gelöst (2 - 3 Tage mit Glasperlen geschüttelt). Zum Anfärben der Autoradiographien wurde die Stammlösung 1:50 mit 0,01 M Phosphatpuffer pH 6,8 verdünnt, für 10 - 15 Min. gefärbt und anschließend luftgetrocknet. Für die Lichtmikroskopie wurde ein Deckglas mit einem Tropfen Glyzerin auf den Objektträger aufgebracht. Die Verwendung von Glyzerin zur "Einbettung" hatte den Vorteil, daß sich das Deckglas leicht entfernen ließ (z.B. für die Entfernung von Silberkörnchen). Es hatte den Nachteil, daß die Präparate nachgefärbt werden mußten, da sie ausbleichen. Die Präparate wurden ohne Deckglas in Präparatekästen aufbewahrt. Hoechst 33 258 Fluoreszenzfarbstoff war ein Geschenk von Dr. O. Leoncini. Die Färbung wurde nach HOLMQUIST (1975) durchgeführt.

3.5. Chromosomale Autoradiographie

^{3}H-dThd markierte Gehirne- bzw. Speicheldrüsenpräparate (s.II.3.2. und 3.3.) wurden mit K.5 Emulsion (Ilford, Essex) überzogen. Unmittelbar nach Erhalt wurde die Emulsion bei 45°C im Verhältnis 1:1 mit Aqua dest. verdünnt und in 10 ml Portionen in Szintillations-Plastikfläschchen abgefüllt. Eine Portion reichte jeweils für die Füllung einer Eintauchküvette aus. Paar-

weise, Rückseite an Rückseite, wurden die Objektträger eingetaucht und in senkrechter Stellung in einem lichtdichten Kasten übernacht getrocknet. Getrocknete Objektträger-Paare wurden mit einer Rasierklinge getrennt und in lichtdichten Plastikkästen bei 18°C für entsprechende Zeiten exponiert. Die Entwicklung der Autoradiographien erfolgte für 2 1/2 Min. bei 20°C mit Kodak D 19-b[1] Entwickler. Silberkörnchen ließen sich durch Tetenal Abschwächer aus den Autoradiographien entfernen (2 Min. eintauchen, 15 Min. wässern).

3.6. Photographie

Giemsa gefärbte Autoradiographien wurden unter Verwendung eines Blaufilters mit einem ZEISS Photomikroskop aufgenommen. Für Hoechst 33 258 gefärbte Präparate wurde ein ZEISS Fluoreszenzmikroskop verwendet. DNS-Fadenautoradiographien wurden mit Hellfeldoptik unter Verwendung der ZEISS Objektive Apo 10/0,22, Apo 25/0,45, PLA 40/1,0 (Öl) und Apo 100/1,32 (Öl) mit einem ZEISS Photomikroskop aufgenommen. Als Filmmaterial diente für alle Aufnahmen Ilford Pan F, 18 DIN.

4. DNS-Fadenautoradiographie

Gehirne (ungefähr 35) und Speicheldrüsen (ungefähr 30), in Medium A gesammelt, wurden in 120 µl Inkubationsmedium B (Basiszusammensetzung) transferiert. Der Inkubationstropfen befand sich in der Mitte einer sterilen Falcon 3001 Petri-Schale. Die Petri-Schale wurde in einer Feuchtigkeitskammer deponiert

---

[1] Kodak D 19-b Entwickler: 2,2 g Methol, 72,0 g Natriumsulfit (Anhydrid), 8,8 g Hydrochinon, 48,0 g Natriumcarbonat (Anhydrid), 4,0 g Kaliumbromid mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen (vor Gebrauch filtrieren).

und für eine Stunde bei Zimmertemperatur (25°C) inkubiert[1].

Nach der Vorinkubation fanden zwei Versuchsprotokolle - a und b - Verwendung (ABB. 3). In Protokoll a wurde ein heißer Puls unterschiedlicher Länge gesetzt, dem ein kalter Puls konstanter Länge mit nicht markiertem dThd folgte. 5, 10, 30, 60, 120 und 240 Min. betrugen die Pulszeiten der Gehirne und 5, 10, 30, 60, 120 und 240 Min. die der Speicheldrüsen. Die Aufnahme der radioaktiven Vorstufen in die Organe erfolgte schnell. In Vorversuchen ergab sich, daß Kurzpulse von nur 1 Minute sich in Autoradiographien von Speicheldrüsen und Gehirnen als Markierung nachweisen lassen. Kürzere Pulse wurden nicht getestet. Eine Minute ist somit die obere Mindestdauer in der Pulsaufnahme.

Der kalte Puls erfolgte durch Transfer der Organe in ein neues Inkubationsmedium, in dem ^{3}H-dThd durch die 10fache Konzentration von unmarkiertem dThd ersetzt war (ABB. 3). Dieser Puls dauerte 45 Min. (Ausnahme einer der 120 Min. Pulsversuche, 120 Min. kalter Puls). Der heiße Puls-Einbau wurde entweder durch Transferieren der Petri-Schale auf Eis gestoppt, oder es wurde ein von Eiswasser durchflossener Binokular-Kühlplatteneinsatz

---

[1] Zweck der Vorinkubation war es, die endogene dTTP Konzentration so stark zu vermindern (inhibierende Wirkung des FdUrd auf die Thymidilat-Synthetase-Reaktion; für Übersichtsartikel s. HEIDELBERGER, 1965), daß der gesetzte Puls möglichst unverfälscht von den Replikations-Enzymkomplexen in den Wachstumspunkten aufgenommen werden kann. Bei korrekter Übereinstimmung der experimentellen Situation mit den Erwartungen, sollten die Anfänge der Pulsmarkierungen der Autoradiogramme (ARGs) einer ARG-Serie mit einer distinkten Stufe einsetzen (s. z.B. ABB. 26 ff.). Unter ARG wird in dieser Arbeit eine kontinuierliche Markierungsspur verstanden, die aus dem Zerfall von in die DNS eingebautem Tritium resultiert (HUBERMAN und RIGGS, 1968). ARG-Serien bezeichnen den experimentellen Befund, daß mehrere ARGs in einer ersichtlichen Serie hintereinander geschaltet sind, was als Ausdruck getrennt replizierender, jedoch aneinandergereihter Abschnitte gedeutet wird.

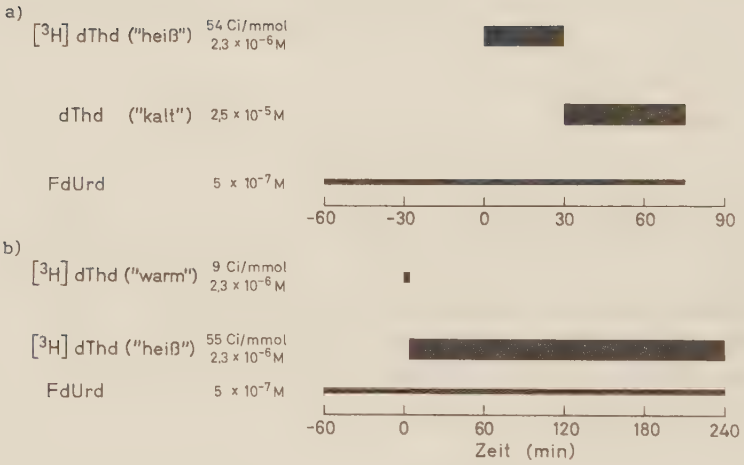

a)
[3H] dThd ("heiß") 54 Ci/mmol 2,3 x 10-6M
dThd ("kalt") 2,5 x 10-5M
FdUrd 5 x 10-7M
-60 -30 0 30 60 90
b)
[3H] dThd ("warm") 9 Ci/mmol 2,3 x 10-6M
[3H] dThd ("heiß") 55 Ci/mmol 2,3 x 10-6M
FdUrd 5 x 10-7M
-60 0 60 120 180 240
Zeit (min)

ABB.3

Legende zu ABB. 3:

Zwei Versuchsprotokolle – a und b – lagen den DNS-Fadenautoradiographien zugrunde.

Oben: In Versuchsprotokoll a wurde die Zeit des heißen Pulses variiert, während die Dauer des kalten Pulses konstant gehalten wurde (z.B. 30 Minuten und 45 Minuten). Die Versuchsanordnung a ermöglicht Aussagen über Replikationsrichtung, Replikationsgeschwindigkeit der Wachstumspunkte und Replicon-längen. Protokoll a wurde auf Gehirne und Speicheldrüsen angewendet.

Unten: In Versuchsprotokoll b folgt einem kurzen warmen Puls (5 Minuten) ein langer heißer Puls (4 Stdn.). Einerseits wird durch die Pulsabfolge die Replikationsrichtung markiert, andererseits war die Pulsdauer des heißen Pulses so gewählt, daß sie länger war als ein durchschnittliches Replicon zu seiner Verdopplung benötigt; d.h. ein initiiertes durchschnittlich langes Replicon sollte von dem heißen Puls bis zu seiner Termination erfaßt werden. Die Umkehr der Pulsfolge von a mit langem heißen Puls sollte Hinweise zum Problem der Termination von Replikationsabschnitten erbringen. Protokoll b wurde nur auf Gehirne angewendet.

zum Stoppen des Einbaus verwendet. Der Transfer der gekühlten Gehirne dauerte ungefähr 7 Min.. Für die Speicheldrüsenpaare wurden ungefähr 15 Minuten benötigt. Alle Einbauversuche erfolgten bei Zimmertemperatur (25°C). Der kalte Puls wurde im Eis gestoppt, bei den Speicheldrüsenversuchen wurden jeweils einige Speicheldrüsenpaare für Kontrollautoradiographien hier entnommen (s. II.3.5.), die Organe in eiskalten Ringer überführt und zweimal gewaschen. Das Organpellet wurde in 1,25 ml Lysemedium L, das 80 µg/ml Kalbsthymus-DNS enthielt, vorsichtig aufgewirbelt und bei 37°C lysiert. Die Lysezeit für Speicheldrüsenpaare betrug durchschnittlich 2 Stdn., für Gehirne 3 Stdn..

Nach der einstündigen Vorinkubation wurden in Protokoll b für 5 Min. ein warmer Puls (9 Ci/mmol, 20,8 µCi/ml) gegeben, dem ein heißer Puls (55 Ci/mmol, 125 µCi/ml) von 4 Stdn. folgte[1] (s.a. ABB. 3b). Der warme Puls wurde im Eis gestoppt, die Gehirne in das heiße Puls-Medium transferiert (Transfer 8 Min.) und für 4 Stdn. inkubiert (25°C). Nach 4 Stdn. wurde der Einbau im Eis gestoppt und die Lyse der Organe erfolgte wie oben dargestellt.

In der Herstellung der DNS-Fadenautoradiographien wurde der von LARK ET AL. (1971) beschriebenen Methode gefolgt. Der Lysattransfer erfolgte durch einen mit einer Mikrometerschraube verbundenen Silikonschlauch (2 mm Durchmesser). Auf den vorbereiteten Objektträgern (Gelatine-Chromalaun, bzw. Poly-L-Lysin beschichtet) wurde der Lysattropfen mit einem Gazestreifen (HD 55) gleichmäßig ausgestrichen, die Objektträger gestürzt, senkrecht gestellt und luftgetrocknet. Die getrockneten Objektträger wurden 15 Min. in 5% TCE gewaschen, dreimal jeweils 5 Min. in 95% und einmal in 100% Äthanol gespült (alle Abläufe bei 4°C) und erneut luftgetrocknet. Wie in II.3.5. beschrieben, wurden die Objektträger mit K.5 Emulsion befilmt, in einem lichtdichten Kasten luftgetrocknet, in lichtundurchlässige Plastikkästen abgepackt und bei 18°C exponiert. Jeder Zeitwert wurde für jedes Organ zweimal durchgeführt (Ausnahme 60 Min. Pulsversuch Speicheldrüsen, einmal). Ausgewertet wurden von der Gehirnserie die Zeitwerte 5, 10, 30 und 60 Min., von der Speicheldrüsen-

---

[1] Von diesem Versuchstyp wurden nur die Gehirne ausgewertet.

serie 30, 60 und 120 Min. . Die 5 und 10 Min. Werte der Speicheldrüsenserie ließen sich nicht auswerten, da kein Markierungsmuster erkennbar war (s.a. III.5.2.1.).

Für die Auswertung wurden die entsprechenden Ausschnitte photographiert und vergrößerte Positive angefertigt. Jede Aufnahmeserie enthielt Aufnahmen einer Objektmikrometer-Skala (0,01 mm, ZEISS) mit allen verwendeten Objektiven. Alle Längenmessungen auf den Positiven wurden mit einem Lineal durchgeführt. Als Vergrößerungsmaßstab diente die parallel mitentwickelte Objektmikrometer-Skala. Für alle Messungen wurden nur interne ARGs herangezogen. In einigen Fällen wurden ARGs, welche keine Pulsmarkierung flankiert von Silberkörnchenspuren geringer Intensität enthielten, gesondert behandelt (s. ERGEBNISSE).

5. Bestimmung der DNS-Menge pro Gehirn, bzw. Speicheldrüsenpaar in D. virilis

Die DNS-Menge pro Speicheldrüsenpaar, bzw. pro Gehirn, wurde mit der Diphenylamin-Methode in der Modifikation von GILES und MYERS (1965) bestimmt[1]. Als Referenz wurde eine Eichkurve mit Kalbsthymus-DNS verwendet. Mit den Absorptionen der Lysate von 10 und 20 Speicheldrüsenpaaren, bzw. den entsprechenden Anzahlen von Gehirnen, wurde in die Eichkurve gegangen und die entsprechenden DNS-Konzentrationen graphisch ermittelt. Das gewogene arithmetische Mittel (Xgew.) der in TABELLE 1 zusammengefaßten Messungen

---

[1] Zu 200 µl DNS-Lysat wurden 100 µl 30% Perchlorsäure, 300 µl 4% Diphenylamin in 96% Essigsäure, 3 µl 1,6% Acetaldehyd zugefügt und bei 30°C übernacht inkubiert. Es wurde die Absorption der Proben bei 595 nm und 700 nm bestimmt und die Differenz 595 - 700 nm auf der Ordinate aufgetragen.

TABELLE 1: DNS-Konzentration in D.virilis Speicheldrüsen und Gehirnen

Anzahl	Speicheldrüsenpaare (DNS) in µg	Gehirne (DNS) in µg
10	0,58	1,68
20	1,49	4,51

Entsprechende Organmengen wurden lysiert und die DNS-Konzentration der Lysate mit der Diphenylamin-Methode in der Modifikation von GILES und MYERS (1965) bestimmt. Als Referenz diente eine Eichkurve mit Kalbsthymus DNS.

ergab pro Speicheldrüsenpaar Xgew. = 0,07 µg[1] und pro Gehirn Xgew. = 0,21 µg.

6. DNS-Markierung

6.1. Markierung von Speicheldrüsen und Gehirnen mit ^{3}H-dThd.

Speicheldrüsen, in Medium A gesammelt, wurden entsprechend dem Versuchsprotokoll zu jeweils 10 Speicheldrüsenpaaren für die gewünschten Zeiten im Basismedium B (plus FdUrd), bzw. im Basismedium B ohne FdUrd (minus FdUrd) vorinkubiert. In 2-Stdn.-Intervallen wurden die Speicheldrüsen für jeweils eine Stunde pulsmarkiert durch Zugabe von 20 µl 2 x Medium A und 20 µl ^{3}H-dThd (52 Ci/mmol, 125 µCi/ml). Die Inkubation wurde bei Zimmertemperatur (25°C) durchgeführt. Der Puls wurde im Eis gestoppt, die Speicheldrüsen zweimal in eiskaltem Ringer gewaschen und das Organpellet 15 Min. in 100 µl 4% TCE (im Eis) extrahiert. Nach zweimaligem Waschen in Ringer wurden die Speicheldrüsen in 350 µl Lysemedium L lysiert. Das gesamte Lysat wurde auf Whatman GF 82 (20 x 20 mm) Glasfilter aufgetropft und bei 80°C getrocknet. Jeweils 10 Min. wurden die Filter in Bädern mit 4% TCE (1 x), 0,8% TCE (3 x) und Methanol (2 x) gewaschen und anschließend wieder bei 80°C getrocknet. Die Radioaktivität der Filter wurde durch Zugabe von Toluol-Scintillator im Flüssigkeits-Scintillations-Spektrometer (Nuclear Chicago, Mark II) bestimmt. Die Werte wurden für Hintergrundstrahlung korrigiert

---

[1] Bei 230 polytänen Kernen pro Speicheldrüsenpaar (MAKINO, 1938) entfallen pro polytänem Kern 0,07 µg:230 = 3,04 x 10^{-4}µg DNS. Unter der Annahme einer Polytänie von 1024 C folgt für das haploide Genom eines polytänen Speicheldrüsenkerns 0,3 pg DNS. Cytophotometrische Messungen ergaben für das haploide Genom von D. virilis 0,39 pg (RASCH, zitiert in ENDOW und GALL, 1975). Der gefundene zu geringe Wert ließe sich gut mit dem Phänomen der Unterreplikation des α-Heterochromatins im Verlauf der Endoreduplikationen in den polytänen Speicheldrüsen erklären.

und auf µg DNS bezogen, unter Verwendung der für D. virilis bestimmten DNS-Menge von 0,07 µg DNS pro Speicheldrüsenpaar. Es wurde davon ausgegangen, daß die nicht bestimmte DNS-Menge von D. miranda in einem vergleichbaren Bereich liegt.

Im Gehirne-Einbautest wurde ähnlich verfahren. Gehirne, in A gesammelt, wurden im Basismedium B zu jeweils 15, mit und ohne FdUrd, vorinkubiert und zu den entsprechenden Zeitpunkten für 10 Min. mit ^{3}H-dThd (55 Ci/mmol) pulsmarkiert (25°C). Für den weiteren Ablauf siehe Speicheldrüsen. Für die Umrechnung der cpm Werte pro µg DNS wurde 0,21 µg pro Gehirn verwendet (s. II.5.).

6.2. ^{3}H-dThd-Markierung und Fraktionierung der Gehirne- und Speicheldrüsen-DNS in Gleichgewichts-Dichtegradienten

Gehirne, bzw. Speicheldrüsen, in Medium A gesammelt, wurden in Basismedium B, erweitert um 20 µl 2 x Medium A und 20 µl ^{3}H-dThd (spezifische Aktivität s. Legenden) für entsprechende Zeiten inkubiert. Der Einbau wurde in Eis gestoppt, die Organe zweimal mit eiskaltem Ringer gewaschen und bei einigen Inkubationen das Pellet 15 Min. im Eisbad mit 4% TCE extrahiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit Ringer wurde das Pellet in 1 ml 2 x SSC aufgenommen. Bei den nicht mit TCE behandelten Inkubationen wurde nach dem ersten Waschen in Ringer das Organpellet unmittelbar in 2 x SSC aufgenommen. Die Suspension wurde auf 400 µg/ml Ribonuclease aus Rinderpankreas (E.C.2.7.7.16) und 100 U/ml Ribonuclease T_1 (E.C.2.7.7.26) gebracht und 1,5 Stdn. bei 37°C inkubiert. Nach Abzentrifugation wurde das Pellet in Lysemedium L resuspendiert und für 2 Stdn. bei 37°C lysiert.

Mit einer CsCl-, bzw. Cs_2SO_4-Stammlösung wurde das Lysat auf die gewünschte Ausgangsdichte eingestellt und in Polyallomer-Röhrchen, mit Paraffinöl überschichtet, bei 40 000 Upm und 25°C in einem 50 Ti Rotor für 60 Stdn. in einer Spinco L2-65B zentrifugiert. Allen Gradienten war ^{14}C-markierte E. coli DNS (583 cpm/

µg) als Dichtemarker zugesetzt. Die Gradienten wurden in konstante Volumina fraktioniert (s. jeweils Legende). Aliquote der Fraktionen wurden auf Whatman GF 81 Glasfilter aufgetropft und bei 80°C getrocknet. Für weitere Behandlung der Filter, siehe II.6.1. . Die mit einem Abbe-Refraktometer (ZEISS) bestimmten Dichten wurden so normiert, daß sich für die E. coli Marker-DNS in den neutralen Gradienten 1,710 g x cm^{-3}, in den alkalischen 1,766 g x cm^{-3} ergab (s.a. STEINEMANN, 1976). Die alkalischen CsCl Gradienten wurden nach FLAMM ET AL. (1967) hergestellt.

6.3. Substitution von Thymidin in der Speicheldrüsen-DNS durch 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdUrd)

Speicheldrüsen, in A gesammelt, wurden in Medium B transferiert, das ergänzt wurde durch 20 µl 2 x Medium A und 20 µl einer Mischung von unmarkiertem BrdUrd und ^{3}H-dThd (55 Ci/mmol) im molaren Verhältnis 9:1 (s. II.2.). Die Speicheldrüsen wurden bei Zimmertemperatur (25°C) für entsprechende Zeiten inkubiert. BrdUrd hatte eine Endkonzentration von 1 x 10^{-5}M; die ^{3}H-dThd Aktivitätenkonzentration betrug 62,5 µCi/ml. Die Weiterbehandlung der Speicheldrüsen erfolgte wie in II.6.2. dargestellt.

7. DNS • DNS in situ-Renaturierung

Durch die in II.6.2. beschriebenen Markierungs- und Fraktionierungsmethoden war es möglich, DNS mit ausreichend hoher spezifischer Aktivität sowohl aus Gehirnen als auch aus Speicheldrüsen zu isolieren. Gehirne, bzw. Speicheldrüsen wurden nach II.6.2. inkubiert, lysiert und in CsCl Gleichgewichts-Dichtegradienten fraktioniert. Der Versuchsablauf der DNS • DNS in situ-Renaturierung von Satellitenfraktionen ist in STEINEMANN (1976) ausführlich dargestellt. Für die DNS • DNS in situ-Renaturierung der Speicheldrüsen-DNS wurde nach demselben Versuchsprotokoll vorgegangen (s.a. Legende zu ABB. 19).

8. Markierungsindex (M.I.) und "Markierte-Mitosen-Technik"

Gehirne, in A gesammelt, wurden für 10 Min. in 40 µl 2 x Medium A, 20 µl ATP (0,126 mg/ml) und 20 µl ^{3}H-dThd (60,8 Ci/mmol, 250 µCi/ml) inkubiert. Der Puls wurde in Eis abgestoppt. Mit Ausnahme der Kontrollgehirne (t = o), die in Eis verblieben, wurden die übrigen Gehirne, jeweils 10, in Medium A gewaschen und in das kalte Puls-Medium, 40 µl 2 x Medium A, 20 µl ATP (0,126 mg/ml) und 20 µl dThd (48,4 µg/ml) transferiert. Alle Inkubationen erfolgten bei Zimmertemperatur (25°C). Zu entsprechenden Zeiten wurde in Eis gestoppt und von jedem Gehirn ein Quetschpräparat (s. II.3.2.) angefertigt. Die Präparate wurden mit Photoemulsion (s. II.3.5.) überzogen und für 16 Tage exponiert. Entwicklung, Färbung und Photographie siehe II.3.5., II.3.4. und II.3.6..

Kontrollautoradiographien (s. II.3.5.) der 5 und 10 Min. Werte, die parallel zu den entsprechenden DNS-Fadenautoradiographien (s. II.4.) angefertigt wurden, dienten als Ausgangsmaterial für die Bestimmung des M.I. der Speicheldrüsenkerne. Die Autoradiographien der t = o Kontrollgehirne wurden zur Bestimmung des Markierungsindexes verwendet (M.I. = Zahl der markierten Zellkerne dividiert durch Gesamtzahl der beobachteten Kerne).

Die Auszählung der markierten, bzw. nichtmarkierten Interphasekerne erfolgte mit einem Okular-Netzmikrometer 10 x 10/20 (ZEISS). Es wurden jeweils willkürlich eingestellte Raster ausgezählt. Die Raster-Werte wurden nach Homogenitätsüberprüfung (χ^2 - Test) vereint. Für die Bestimmung der Markierungswerte von Metaphasen und polytänen Speicheldrüsenkernen wurden die Objektträger systematisch abgesucht und alle Metaphasen, bzw. polytänen Kerne, erfaßt. Die ausgezählten Metaphasenwerte wurden freundlicherweise durch Vermittlung von Prof. Dr. M. Rajewsky von Dr. G.G. Steel (Institute of Cancer Research, London) mit einem Computerprogramm zur Auswertung von markierten

Mitosedaten optimalisiert und ausgewertet. Die Hintergrundmarkierung in den Gehirneautoradiographien betrug 4 Silberkörnchen pro 100 μm^2. Alle Zellen, die über dieser Silberkörnchen-Dichte lagen, wurden als markiert angesprochen.

9. Sonstige Materialien

Penizillin G, Kaliumsalz (B grade), Streptomycin (B grade), 5-Brom-2'-desoxyuridin (A grade), Thymidin (A grade), Uridin (A grade), Dithiothreitol (A grade), Piperazin-N, N'-bis (2-Äthansulfonsäure), Ribonuclease aus Rinderpankreas (A grade, E.C. 2.7.7.16) und Ribonuclease T_1 (B grade, E.C. 2.7.7.26) wurden von Calbiochem bezogen. 5-Fluor-2'-desoxyuridin (reinst) von Serva; ^{3}H-Thymidin von New England Nuclear und Amersham; ATP von Pharma-Waldhof, Mannheim; 3-mercapto-1,2-propandiol von Schuchardt, München; Sarkosyl NL 97 von Ciba-Geigy, Basel; Poly-L-Lysin (P1886) und Kalbsthymus-DNS von Sigma, München; Siliclad von Clay Adams; Photogelatine No. 7546 von Koepf und Söhne; Giemsa (Azurgemisch) von Chroma-Gesellschaft, Stuttgart-Untertürckheim; Tetenal-Abschwächer von Tetenal-Photowerk, Hamburg-Berlin; Metol von Agfa-Gevaert. Alle nicht gesondert vermerkten Chemikalien waren p.a. Substanzen und wurden von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen. 3001 Gewebekultur-Petri-Schalen der Firma Falcon (Oxnard, Kalifornien) von Becton, Dickinson GmbH, Heidelberg; HD 55 Gaze von der Züricher Beteltuchfabrik AG. GF 81 und GF 82 Chromatographie-Papier der Firma Whatman von Hormuth-Vetter, Wiesloch.

III. ERGEBNISSE

1. Der Karyotyp von D. virilis und seine Besonderheiten

Der diploide Zellkern von D. virilis enthält 10 stäbchen- und 2 punktförmige Chromosomen (s. ABBn. 4b und 6a). Die proximale Hälfte jedes der stäbchenförmigen, akrozentrischen Autosomen und des X Chromosoms besteht aus α-Heterochromatin (HEITZ, 1934), die distale aus Euchromatin (ABB. 4a). Das dazwischen liegende β-Heterochromatin tritt erst im polytänen Zustand zutage. Obwohl das Y vollständig heterochromatisch ist, enthält es vermutlich keine Satellitensequenzen (GALL, 1971). Das gesamte α-Heterochromatin ist in den diploiden Interphasekernen in einem Chromozentrum vereint (ABB. 6a).

Die polytänen Kerne der larvalen Speicheldrüsenzellen enthalten 1 kurzen und 5 lange Chromosomenarme, die proximal im Chromozentrum zusammenhängen. Dieses besteht aus zwei Heterochromatintypen, nach HEITZ (1934) α- und β-Heterochromatin genannt. Das α-Heterochromatin ist stark kondensiert und wächst, wie HEITZ (1934) zeigen konnte, im Verlauf der endomitotischen Reduplikationen in den polytänen Speicheldrüsenkernen nicht im selben Umfang mit wie das Euchromatin. Das β-Heterochromatin ist lockerer strukturiert und zeigt andeutungsweise Querscheibenstruktur (BEERMANN, 1962). Es wächst im selben Umfang wie das Euchromatin. Im männlichen Genom ist das Y Chromosom zusammen mit den β-heterochromatischen Abschnitten der restlichen Chromosomen im Chromozentrum vereinigt.

Mit Hoechst 33 258, einem Fluoreszenzfarbstoff, läßt sich spezifisch das dA•dT-reiche Centromerenheterochromatin in D. virilis anfärben (HOLMQUIST, 1975). Während das Sammelchromozentrum der diploiden Interphasekerne (ABB. 6a) ungefähr die Hälfte der DNS-Menge des gesamten D. virilis Genoms enthält, kann dies sicherlich nicht mehr für das α-Heterochromatinkörperchen (ABBn. 5 und 6b) im Chromozentrum der polytänen Speicheldrüsenkerne zutreffen. Es konnte gezeigt werden, daß D. virilis drei

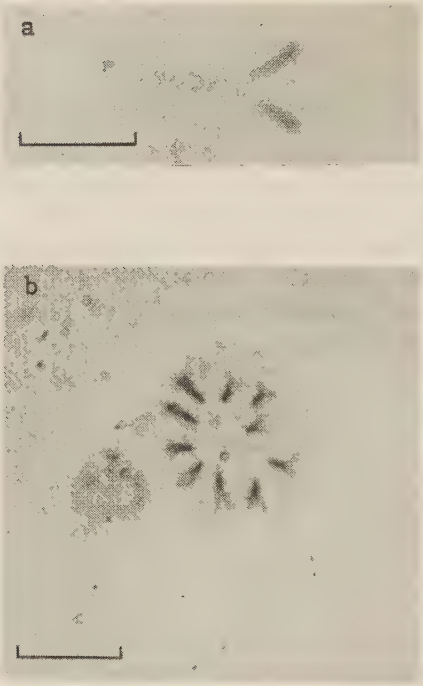


ABB.4

Legende zu ABB. 4:

a) Homologenpaar einer Neuroblasten Prometaphaseplatte von D.virilis (3. Larvenstadium). Die Chromosomen lassen sich in zwei Hälften aufteilen, das proximale α-Heterochromatin und das distal liegende Euchromatin. Dazwischen liegt das in mitotischen Chromosomen cytologisch nicht aufzulösende β-Heterochromatin. Der euchromatische Abschnitt ist in diesem Homologenpaar somatisch gepaart; die restlichen Homologen dieser Prometaphaseplatte (nicht gezeigt) waren benachbart, jedoch nicht gepaart. Das α-Heterochromatin des Homologenpaars ist nicht verklebt. Giemsa gefärbt. Maßstab 5 μm.

b) Neuroblasten Metaphaseplatte von D.virilis (3. Larvenstadium). Der diploide Zellkern enthält 10 stäbchen- und 2 punktförmige Chromosomen. Alle stäbchenförmigen Chromosomen lassen sich in eine α-heterochromatische und eine euchromatische Hälfte aufteilen, mit Ausnahme des ganz heterochromatischen Y Chromosoms. Die α-Heterochromatinhälften weisen in Richtung des Mittelpunktes der kreisförmig angeordneten Chromosomen. Die noch ungeteilten Geschwisterchromosomen sind im α-Heterochromatin verklebt (Gegensatz zur somatischen Homologenpaarung). Giemsa gefärbt. Maßstab 10 μm.

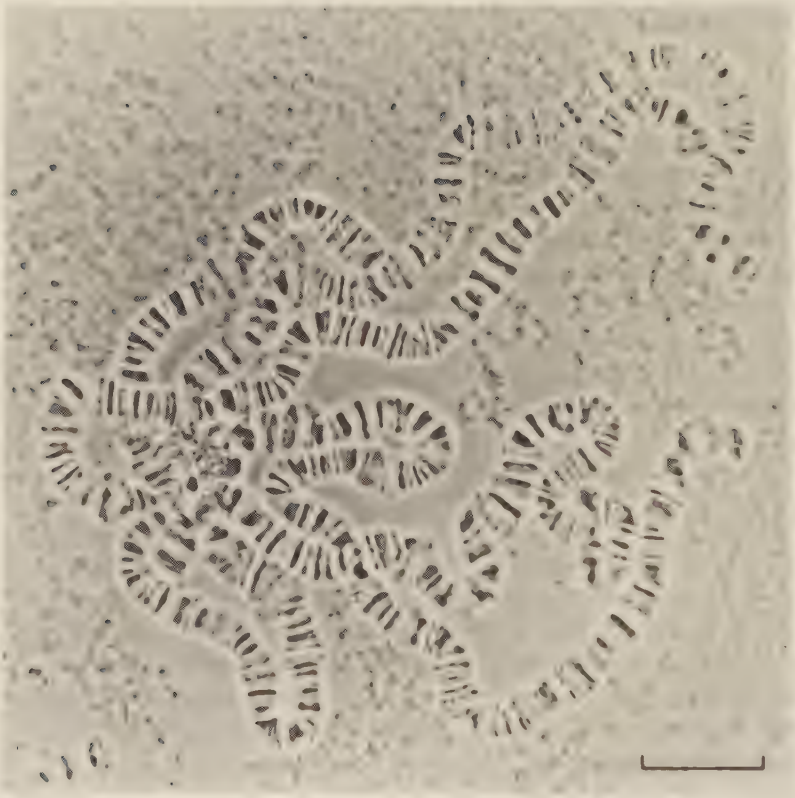
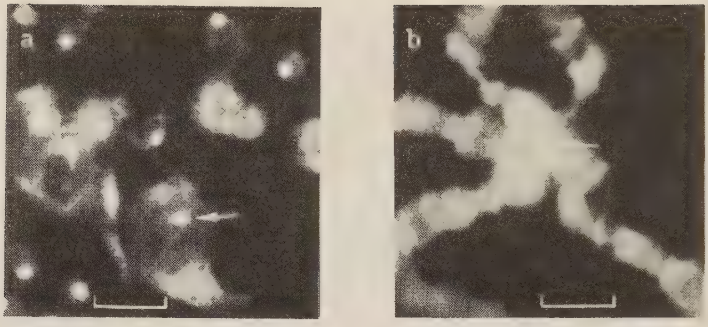


ABB.5

Legende zu ABB. 5:

Polytäner Speicheldrüsenkern einer weiblichen D.virilis Larve (3. Larvenstadium). Die 5 langen euchromatischen Riesenchromosomenarme und das Chromosom VI entspringen einem Chromozentrum. Das stark lichtbrechende kompakte Körperchen im Zentrum ist dem Sammelchromozentrum der diploiden Interphasekerne homolog. Diese Struktur besteht nach HEITZ (1934) aus α-Heterochromatin. Die Hauptmasse des Chromozentrums wird vom lockeren β-Heterochromatin gebildet.
Ungefärbt, Phasenkontrast. Maßstab 20 μm.


a
b

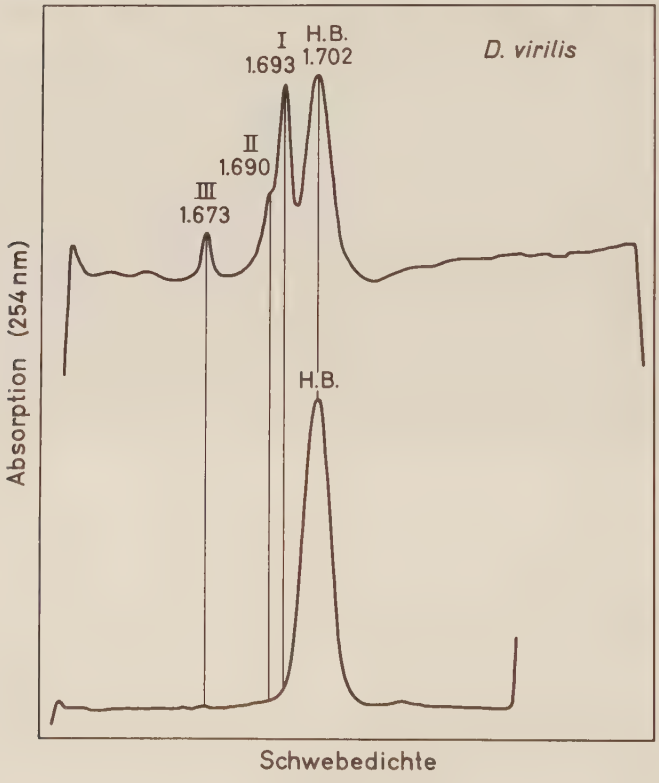

I
1.693
H.B.
1.702
D. virilis
II
1.690
III
1.673
H.B.
Absorption (254 nm)
Schwebedichte

ABB.6

ABB.7

Legende zu ABB. 6:

Hoechst 33 258 gefärbte larvale Neuroblasten Metaphaseplatte (a) und Chromozentrum eines larvalen polytänen Speicheldrüsenkerns (b) von D.virilis. dA·dT-reiche DNS Abschnitte zeigen verstärkte Fluoreszens (WEISBLUM, 1973). Fluoreszenzmikroskop/Standard (ZEISS), Erregerfilter I, Sperrfilter 44/53, bzw. Erregerfilter IV, Sperrfilter 41/47. Maßstab 10 µm.

a) Die Neuroblasten Metaphaseplatte ist umgeben von Interphasekernen. Die heterochromatischen Hälften der stäbchenförmigen Metaphasechromosomen, die alle zum Zentrum ausgerichtet sind, fluoreszieren heller als die euchromatischen. Diese α-Heterochromatinabschnitte sind in den Interphasekernen zu einem hell fluoreszierenden Sammelchromozentrum verklebt.

b) Chromozentrum eines polytänen larvalen Speicheldrüsenkerns. Das α-heterochromatische Körperchen (Sammelchromozentrum) im Chromozentrum und eine Bande im Chromosom IV (ADKISSON et al., 1971) zeigen deutlich erhöhte Fluoreszenz gegenüber dem mehr diffus erscheinenden β-Heterochromatin. Der Flächeninhalt (beide im selben Vergrößerungsmaßstab) des α-Heterochromatinkörperchens (b) und der Sammelchromozentren (a) ist sehr ähnlich.

Legende zu ABB. 7:

Dichteverteilung von D.virilis DNS in analytischen neutralen CsCl Gleichgewichts-Dichtegradienten. Die DNS-Proben wurden 22 Stdn. mit 44 800 UpM bei 25°C in einer MSE Centriscan 75 zentrifugiert.
Oben: Die DNS wurde aus larvalen D.virilis Gehirnen (s. STEINEMANN, 1978) isoliert. Die drei Satellitenbanden I, II und III umfassen 45% der Gesamt-DNS.
Unten: Die DNS wurde aus larvalen Speicheldrüsen isoliert (STEINEMANN, 1978). Mit dieser Methode lassen sich in der Speicheldrüsen-DNS keine Satellitenbanden mehr nachweisen.

Satelliten enthält, die 45% der Gesamt-DNS ausmachen und die sich mit der in situ-Hybridisierungstechnik im α-Heterochromatin lokalisieren lassen (GALL, 1971; STEINEMANN, 1976 und s. III.3.).

Die Korrelation der Satellitensequenzen von D. virilis mit der cytologischen Struktur des α-Heterochromatins erlaubt eine relativ einfache Demonstration der Unterreplikation des α-Heterochromatins im Verlauf der Endoreduplikationen der polytänen Speicheldrüsenkerne. Ein Vergleich der analytischen Profile neutraler CsCl Gleichgewichts-Dichtegradienten von DNS, einerseits isoliert aus larvalen Gehirnen, andererseits aus den hochpolytänen larvalen Speicheldrüsen, macht dies deutlich (ABB. 7). Die Satellitensequenzen lassen sich mit dieser Methode in der Speicheldrüsen-DNS nicht darstellen (s.a. GALL, 1971 und STEINEMANN, 1978). Ihr Anteil an der Speicheldrüsen-DNS beträgt unter 1%.

2. ^{3}H-dThd-Markierung larvaler Drosophila Gehirne und Speicheldrüsen in vitro in einem Organkulturmedium

2.1. Versuche zum ^{3}H-dThd-Einbau

Biologische Markierungsexperimente (z.B. Kurzpulsmarkierung) definierter Zeitdauer und Endkonzentration erfordern experimentelle Rahmenbedingungen, die nur von Suspensionszellkulturen ideal erfüllt werden. Sonst kommen Gewebe- bzw. Organkulturen den genannten Prämissen am nächsten.

Das für die Einbauversuche mit larvalen Drosophila Gehirnen und Speicheldrüsen benutzte Medium B ist ein modifiziertes Medium A (s. MATERIAL UND METHODEN), das seinerseits eine Modifikation von COHENS G Medium (COHEN und GOTCHEL, 1971) darstellt. Jeweils 10 vorinkubierte Speicheldrüsenpaare von D. miranda[1] wurden in

---

[1] Es wurden ursprünglich verschiedene Drosophila Arten (D. miranda, D. melanogaster und D. virilis) für die Einbauversuche herangezogen. Es zeigte sich kein grundlegender Unterschied im Einbauverhalten der verschiedenen Arten.

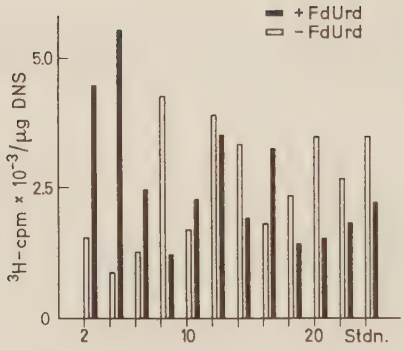

+ FdUrd
- FdUrd
5.0
2.5
0
^{3}H-cpm x 10^{-3}/µg DNS
2
10
20
Stdn.

ABB.8

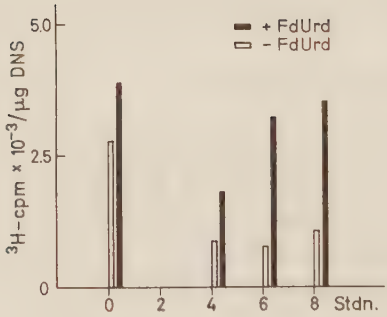

+ FdUrd
- FdUrd
5.0
2.5
0
^{3}H-cpm x 10^{-3}/µg DNS
0
2
4
6
8
Stdn.

ABB.9

Legende zu ABB. 8:

Einbau von ^{3}H-dThd in Speicheldrüsen von D.miranda in vitro.

Speicheldrüsen von D.miranda wurden mit, bzw. ohne FdUrd für entsprechende Zeiten in Medium B inkubiert. In 2stündigen Intervallen wurden jeweils 10 Speicheldrüsen für 60 Min. mit ^{3}H-dThd (52 Ci/mmol) pulsmarkiert. Der ^{3}H-dThd-Einbau in die Speicheldrüsen-DNS wurde auf GF 82 Filtern im Flüssigkeits-Szintillationszähler gemessen (s. MATERIAL und METHODEN). Die gemessenen cpm-Werte sind auf µg Speicheldrüsen-DNS normiert.

Legende zu ABB. 9:

Einbau von ^{3}H-dThd in Gehirne von D.virilis in vitro.

Gehirne von D.virilis wurden mit, bzw. ohne FdUrd für entsprechende Zeiten in Medium B inkubiert. Zu den Zeiten t = 0, 4, 6 und 8 Stdn. wurden jeweils 15 Gehirne für 10 Min. mit ^{3}H-dThd (55 Ci/mmol) pulsmarkiert. Der ^{3}H-dThd-Einbau in die Gehirne-DNS wurde auf GF 82 Filtern im Flüssigkeits-Szintillationszähler, wie in MATERIAL und METHODEN beschrieben, gezählt. Die gemessenen cpm-Werte sind auf µg Gehirne-DNS normiert.

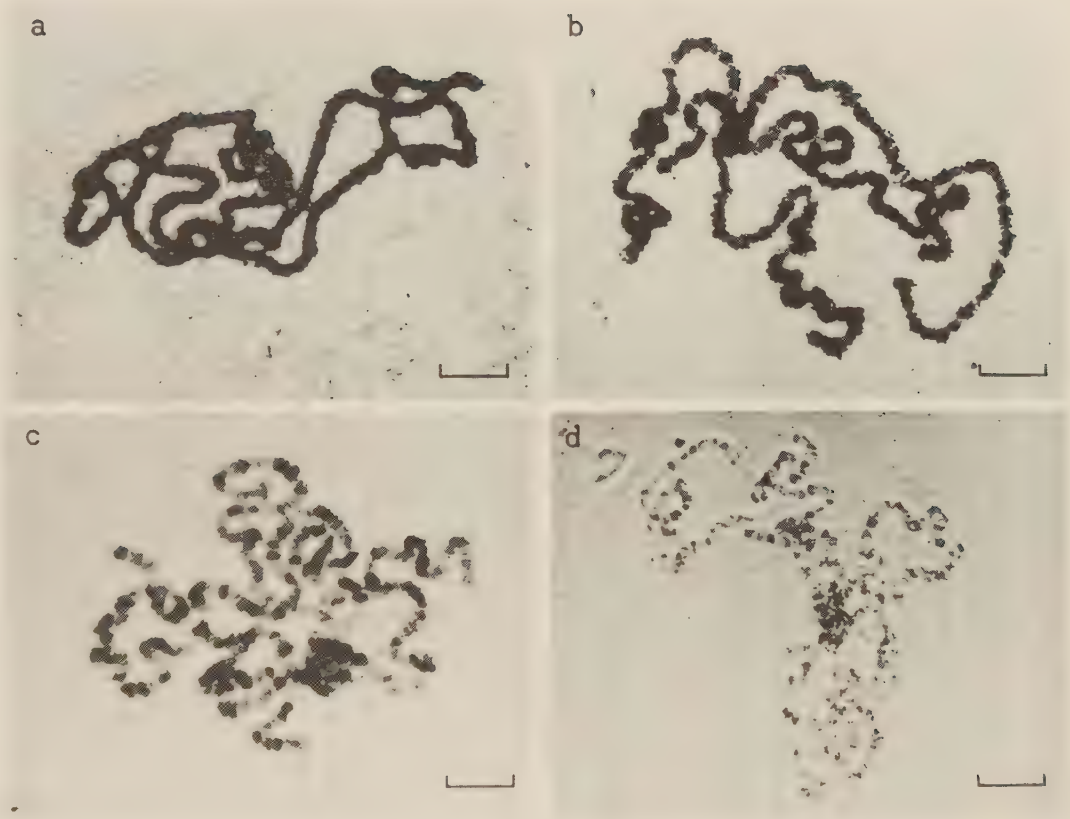


ABB.10

Legende zu ABB. 10:

Replikationsmuster polytäner Speicheldrüsenkerne von D.melanogaster. Nach 10stündiger Vorinkubation in Medium B erfolgte ein 75minütiger ^{3}H-dThd (44 Ci/mmol, 143 µCi/ml) Puls. Die Autoradiographien wurden, wie in MATERIAL und METHODEN beschrieben, angefertigt. Maßstab entspricht 20 µm.

a) Kontinuierliche Markierung; (b) Übergang zu diskontinuierlich II Markierung; (c) frühe diskontinuierliche II Markierung und (d) späte diskontinuierlich II Markierung (Musterbezeichung s. Text).

2-Stdn.-Intervallen für 1 Std. mit ^{3}H-dThd inkubiert und der Einbau des ^{3}H-dThds in die DNS mit und ohne FdUrd gemessen. In beiden Fällen behielten die Speicheldrüsenpaare die Fähigkeit ^{3}H-dThd in ihre DNS einzubauen, selbst nach 24stündiger in vitro-Inkubation (ABB. 8). Während im ersten Viertel (bis 6 Stdn.) die Einbauwerte im Verlauf der Inkubationszeit in Gegenwart von FdUrd höher lagen als ohne, ist dies im letzten Viertel (18 - 24 Stdn.) umgekehrt.

Die Fähigkeit, auch nach längerer in vitro-Inkubation DNS zu synthetisieren, wurde für D. virilis Gehirne mit und ohne FdUrd über 8 Stdn. hinweg mit 10minütigen Kurzpulsen (ABB. 9) ermittelt. Die Gehirne bauten auch nach 8 Stdn. Vorinkubation noch ^{3}H-dThd ein. Unter der Annahme, daß die Variation der cpm-Werte der Einbauserie ohne FdUrd nach jeweils 4, 6, oder 8 Stdn. zufällig ist, läßt sich ein Mittelwert von $\bar{x}$ = 909 cpm/µg berechnen. Bezieht man nun auf diesen die entsprechenden cpm-Werte der FdUrd Einbauserien, so ergibt sich für die genannten Zeiten eine 2,0-, 3,6-, bzw. 3,9fache Erhöhung des ^{3}H-dThd-Einbaus. Ein vergleichbares Ansteigen des ^{3}H-dThd-Einbaus mit zunehmender Inkubationszeit konnte in der Speicheldrüsen-DNS nicht beobachtet werden.

Die größten spezifischen Aktivitäten, erzielt unter den oben beschriebenen Inkubationsbedingungen, betrugen für die Gehirn-DNS nach 24stündiger Inkubation 6 x 10^{5} dpm/µg (ABB. 14) und für die Speicheldrüsen-DNS nach 4stündiger Einbaudauer 5 x 10^{5} dpm/µg (vgl. TABELLE 2 und Legende zu ABB. 19).

Autoradiographien polytäner Speicheldrüsenkerne bestätigen, daß es sich bei dem Einbau von ^{3}H-dThd in vitro um normale S-Phasen-DNS-Synthese handelt (ABB. 10). Neben nicht markierten Kernen fanden sich im wesentlichen die gleichen Markierungsmuster wie sie z.B. von ARCOS-TERÁN (1972) beschrieben wurden.

2.2. Dichteverteilung der neusynthetisierten D. virilis DNS in präparativen CsCl Gleichgewichts-Dichtegradienten

Larvale Gehirne und Speicheldrüsenpaare von D. virilis wurden unter den oben genannten Bedingungen inkubiert und in

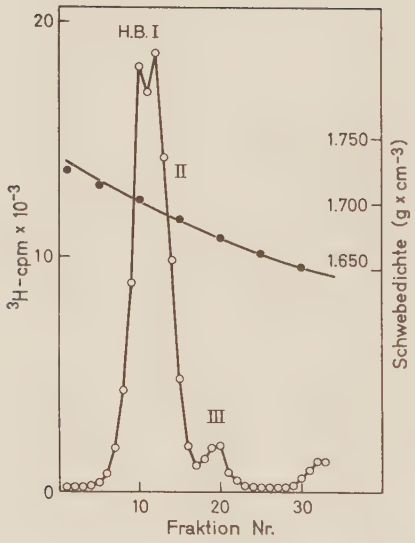

20
10
0
H.B. I
II
III
1.750
1.700
1.650
^{3}H-cpm x 10^{-3}
Schwebedichte (g x cm^{-3})
10
20
30
Fraktion Nr.

ABB.11

Legende zu ABB. 11:

Neutraler präparativer CsCl Gleichgewichts-Dichtegradient mit ^{3}H-dThd markierter DNS, isoliert aus 50 larvalen Gehirnen von D.virilis (s. MATERIAL und METHODEN). 50 larvale Gehirne des 3. Larvenstadiums von D.virilis wurden 18,5 Stdn. in Medium B, erweitert um 20 µl 2 x Medium A und 20 µl ^{3}H-dThd (52 Ci/mmol; 125 µCi/ml), inkubiert. Der dargestellte CsCl Gleichgewichts-Dichtegradient ist eine Rezentrifugation eines vorangegangenen CsCl Gleichgewichts-Dichtegradienten, nachdem die DNS enthaltenden Fraktionen vereint und durch eine 23 Gauge-Kanüle geschert wurden. Die Ausgangsdichte des Gradienten betrug 1,704 g x cm^{-3}. Die Zentrifugation erfolgte bei 25°C in einem 50 Ti-Rotor bei 40 000 UpM für 60 Stdn. in einer Spinco L2-65 B Ultrazentrifuge. 150 µl Fraktionen wurden aufgefangen und 20 µl jeweils auf GF 81 Glasfaserfiltern aufgetropft und behandelt wie in MATERIAL und METHODEN beschrieben. Der Refraktionsindex wurde mit einem Abbe-Refraktometer (ZEISS) gemessen. Die gemessenen Dichtewerte wurden normalisiert, so daß sich für die Marker-DNS (nicht gezeigt) die in der Abbildung wiedergegebene Dichte ergab. Die Bandenbezeichnung entspricht ABB. 7.

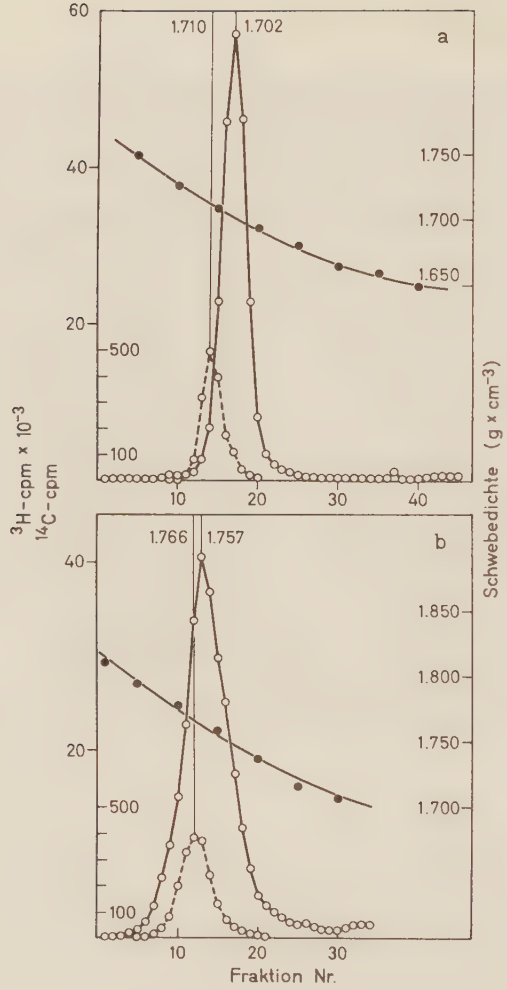

60
40
20
1.710
1.702
a
1.750
1.700
1.650
500
100
10
20
30
40
1.766
1.757
b
1.850
1.800
1.750
1.700
Fraktion Nr.
^3H-cpm x 10^{-3}
^{14}C-cpm
Schwebedichte (g x cm^{-3})

ABB.12

Legende zu ABB. 12:

Neutraler (a) und alkalischer (b) präparativer CsCl Gleichgewichts-Dichtegradient mit ^{3}H-dThd markierter DNS, isoliert aus 50 larvalen Speicheldrüsenpaaren von D.virilis (s. MATERIAL und METHODEN). Die Zentrifugationsbedingungen von (a) und (b) sind wie in Legende zu ABB. 11 beschrieben. Die gemessenen Dichtewerte wurden normalisiert, so daß sich für die Marker-DNS die in der Abbildung wiedergegebene Dichte ergab. o——o ^{3}H-dThd markierte DNS aus D.virilis Speicheldrüsen isoliert; o----o ^{14}C-markierte E.coli DNS.

a) 50 larvale Speicheldrüsenpaare von D.virilis wurden 4 Stdn. in Medium B, erweitert um 20 µl 2 x Medium A und 20 µl ^{3}H-dThd (55 Ci/mmol; 125 µCi/ml), inkubiert und in Medium L lysiert, das 4 mg/ml Proteinase K enthielt. ^{14}C-markierte E.coli DNS (583 cpm/µg) wurde als Dichtestandard (1,710 g x cm^{-3}) zugegeben und die Ausgangsdichte des Gleichgewichts-Dichtegradienten mit einer CsCl-Stammlösung auf ρ = 1,699 g x cm^{-3} eingestellt. 150 µl Fraktionen wurden gesammelt und jeweils 50 µl davon auf GF 81 Glasfilter aufgetropft (s. MATERIAL und METHODEN).

b) Die DNS enthaltenden Fraktionen von Gradient (a) wurden vereint, ^{14}C-markierte E.coli DNS als Dichtestandard (1,766 g x cm^{-3}) zugegeben und für einen alkalischen CsCl Gleichgewichts-Dichtegradient vorbereitet (s. MATERIAL und METHODEN). Die Ausgangsdichte betrug ρ = 1,768 g x cm^{-3}. 150 µl Fraktionen wurden aufgefangen und 100 µl jeweils auf GF 81 Filter aufgetropft und weiterverarbeitet, wie in MATERIAL und METHODEN beschrieben.

Medium L lysiert. In präparativen CsCl Gleichgewichts-Dichtegradienten ergaben sich dann die in ABBn. 11 und 14 A, B und ABB. 12a dargestellten Dichteverteilungen.

Die Dichteverteilung ^{3}H-dThd markierter DNS, isoliert aus 50 Gehirnen, die 18,5 Stdn. in Medium B inkubiert wurden, läßt deutlich Hauptbande (H.B.) Satellit I und III erkennen (ABB. 11). Satellit II wird unter den hier gewählten Zentrifugationsbedingungen nicht aufgelöst (vgl. ABB. 14A,B). Nicht in allen Gradienten war der Satellit I so überproportional stark vertreten wie in ABB. 11. Die gefundene Dichteverteilung der markierten DNS folgt im wesentlichen derjenigen der aus adulten Fliegen isolierten unmarkierten Kern-DNS; d.h., es lassen sich keine signifikanten Anteile markierter mitochondrialer DNS feststellen. Außerdem lassen die Dichteverteilungen unter den beschriebenen Isolations- und Inkubationsbedingungen der Organe keine feststellbaren Mengen an mitmarkierter Fremd-DNS (Bakterien; Pilze, insbesondere Hefen; usw.) erkennen. Korrigiert man die Werte der Satellitenbanden für ihren größeren dA·dT-Gehalt (für die Markierung wurde nur ^{3}H-dThd verwendet), ist die Verteilung der Radioaktivität in Hauptbande und Satellitenbande proportional dem jeweiligen DNS Anteil. Für eine präferentielle Markierung von Haupt- und Satellitenbanden gibt es keine Anhaltspunkte.

Entsprechend ihres asymmetrischen dG-dT Anteils (VINOGRAD ET AL., 1963) lassen sich die Einzelstränge der Satelliten-DNS von D. virilis im alkalischen CsCl Gleichgewichts-Dichtegradienten in schwere Einzelstränge: H I, H II und H III, bzw. leichte Einzelstränge: L I, L II und L III (GALL ET AL., 1971) auftrennen. Dementsprechend sind die drei schweren Stränge H I, H II und H III in der nur mit ^{3}H-dThd markierten DNS (ABB. 14a-d) stärker markiert als die leichten (STEINEMANN, 1976). Vor allem die Einzelstränge des Satelliten I zeigen im alkalischen CsCl Gleichgewichts-Dichtegradienten eine sehr große Dichteasymmetrie. So bandet H I bei ρ = 1,798 g x cm^{-3} und L I bei ρ = 1,696 g x cm^{-3} (s. auch GALL ET AL., 1971); d.h.,den leichten und schweren Strang von Satellit I trennt eine Dichtedifferenz von ungefähr 0,1 g x cm^{-3} . Die neutrale Hauptbanden-DNS dagegen bandet im alkalischen CsCl Gleichgewichts-Dichtegradienten bei 1,757 g x cm^{-3}

und zeigt keine Asymmetrie. Die gute Trennung des Satelliten I von der Hauptbande in alkalischen Gleichgewichts-Dichtegradienten ermöglicht die Überprüfung der isolierten, replizierten Speicheldrüsen-DNS auf Satellitenanteile. Aus der erhaltenen monophasischen Dichteverteilung (ABB. 12b) folgt, daß die hochpolytänen Speicheldrüsen zum Zeitpunkt der Inkubation keine mit dieser Methode nachweisbaren Satellitensequenzen mitreplizieren (vgl. a. ABB. 19). Wie auch schon für Gehirne gezeigt, fehlen nachweisbare Mengen markierter Mitochondrien-DNS oder sonstiger Fremd-DNS.

2.3. ^{3}H-dThd-*in vitro*-Einbau ist Folge semikonservativer DNS-Replikation in den untersuchten Organen

Der Einbau von neuen Basen in die DNS kann auf zwei Wegen geschehen, entweder im Gefolge der regulären semikonservativen DNS-Replikation oder als "repair", womit per Definition ein Baseneinbau außerhalb der S-Phase bezeichnet wird. Durch Markierung der Basen läßt sich der Einbau verfolgen. Die Base kann entweder radioaktiv oder durch eine unterschiedliche Dichte (z.B. BrdUrd) markiert sein. Während die semikonservative Replikation lange neu synthetisierte Strecken umfaßt, erfolgt die "repair"-Synthese in kleinen "patches" (PETTIJOHN und HANAWALT, 1964). So sollte in Anwesenheit von BrdUrd, einer dem Thymidin analogen Base, die semikonservativ replizierte DNS eine große Dichteveränderung zeigen. Andererseits sollte im Verlauf der nur "repair"-Synthese die Insertion von kleinen "patches" entlang der gesamten DNS nur zu einer sehr geringen Dichteänderung führen.

D. virilis Speicheldrüsen wurden für entsprechende Zeiten in Medium B inkubiert (s. Legende zu TABELLE 2 und MATERIAL UND METHODEN), das nichtmarkiertes BrdUrd und radioaktives ^{3}H-dThd (55 Ci/mmol) im molaren Verhältnis 9:1 enthielt. Einige typische Einbauergebnisse sind in TABELLE 2 zusammengestellt. Bildet man den Mittelwert aus den nur ^{3}H-dThd (55 Ci/mmol, 125 µCi/ml' Einbauwerten der TABELLE 2, wobei der 3-Stdn.-Wert auf 4 Stdn. hochgerechnet und die Werte für 50 Speicheldrüsenpaare auf 100 umgerechnet wurden, so erhält man 181 925 cpm/µg. Der Mittelwert der

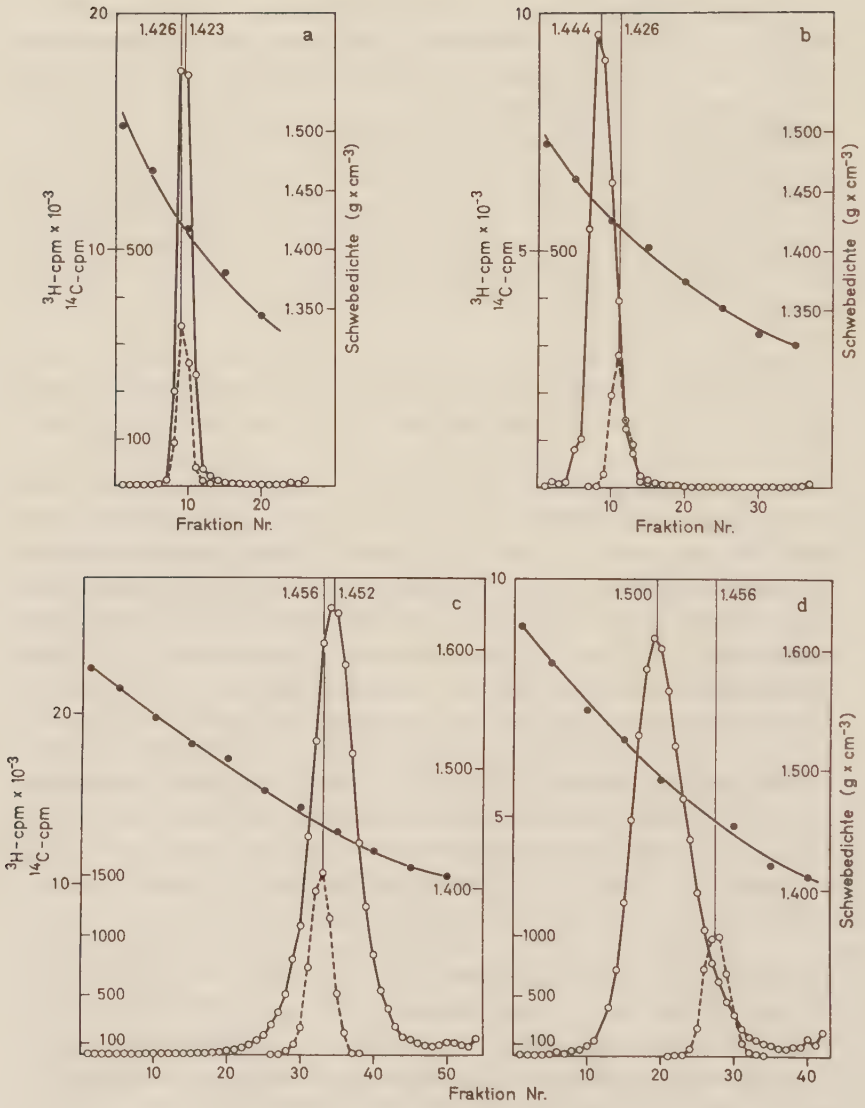

a
1.426
1.423
b
1.444
1.426
c
1.456
1.452
d
1.500
1.456
^{3}H-cpm x 10^{-3}
^{14}C-cpm
Schwebedichte (g x cm^{-3})
Fraktion Nr.

ABB.13

Legende zu ABB. 13:

Neutraler (a) und alkalischer (c) präparativer Cs_2SO_4 Gleichgewichts-Dichtegradient mit ^{3}H-dThd markierter DNS, isoliert aus 50 larvalen Speicheldrüsenpaaren von D.virilis (s. MATERIAL und METHODEN). (b) und (d) zeigen die Dichteverteilung von BrdUrd substituierter DNS, isoliert aus 50 larvalen Speicheldrüsenpaaren von D.virilis in neutralen und alkalischen präparativen Cs_2SO_4 Gleichgewichts-Dichtegradienten (s. MATERIAL und METHODEN). Die Zentrifugationsbedingungen der Gradienten (a) - (d) entsprechen den in ABB. 11 beschriebenen. Die gemessenen Dichtewerte wurden normalisiert, so daß sich für die Marker-DNS die in der Abbildung wiedergegebene Dichte ergab.

a) 50 larvale Speicheldrüsenpaare von D.virilis wurden 3 Stdn. in Medium B, erweitert um 20 µl 2 x Medium A und 20 µl ^{3}H-dThd (55 Ci/mmol; 125 µCi/ml), inkubiert und in Medium L lysiert, das 4 mg/ml Proteinase K enthielt. Nach Zugabe von ^{14}C-markierter E.coli DNS (1,426 g x cm^{-3}; ERICKSON und SZYBALSKI, 1964) als Dichtestandard, wurde das Lysat mit einer Cs_2SO_4-Stammlösung auf die Ausgangsdichte ρ= 1,446 g x cm^{-3} eingestellt. 200 µl Fraktionen wurden aufgefangen und jeweils 25 µl auf GF 81 Filter pipettiert und für die Flüssigkeits-Szintillationsmessung vorbereitet (s. MATERIAL und METHODEN).

b) 50 larvale Speicheldrüsenpaare von D.virilis wurden 5 Stdn. in Medium B inkubiert, das um 20 µl 2 x Medium A und 20 µl einer Mischung von unmarkiertem BrdUrd und ^{3}H-dThd (55 Ci/mmol) im molaren Verhältnis 9:1 erweitert war. Die Endkonzentration von BrdUrd betrug 1 x 10^{-5}M. ^{14}C-markierte E.coli DNS wurde dem Speicheldrüsenlysat zugegeben und die Ausgangsdichte von ρ= 1,444 g x cm^{-3} mit einer Cs_2SO_4-Stammlösung eingestellt. 150 µl Fraktionen wurden aufgefangen und 25 µl jeweils auf GF 81 Filter pipettiert und für die Flüssigkeits-Szintillationsmessung vorbereitet (s. MATERIAL und METHODEN). Der Dichteunterschied in diesem Experiment zwischen BrdUrd substituierter und nicht substituierter DNS beträgt $\Delta\rho$= 0,021 g x cm^{-3}. Dies entspricht einer dThd-Substitution durch BrdUrd von 75% (s.a. TABELLE 3).

(c) und (d) sind die entsprechenden alkalischen Cs_2SO_4 Gleichgewichts-Dichtegradienten zu (a) und (b). Die DNS enthaltenden Fraktionen von (a) bzw. (b) wurden jeweils vereint und nach Zugabe von ^{14}C-markierter E.coli DNS für einen alkalischen Cs_2SO_4 Gleichgewichts-Dichtegradienten vorbereitet (s. MATERIAL und METHODEN). Die Ausgangsdichte von Gradient (c) war ρ= 1,485 g x cm^{-3} und von (d) ρ= 1,489 g x cm^{-3}. In Gradient (c) wurden 100 µl Fraktionen aufgefangen und 75 µl jeweils auf GF 81 Filter pipettiert; in (d) wurden 150 µl Fraktionen gesammelt und 100 µl jeweils auf GF 81 Filter pipettiert. Die Filter wurden für die Flüssigkeits-Szintillationsmessung, wie in MATERIAL und METHODEN beschrieben, vorbereitet. Die Dichte für die denaturierte E.coli DNS im alkalischen Cs_2SO_4 Gleichgewichts-Dichtegradient wurde mit einem Abbe-Refraktometer bestimmt und für Gradient (c) und (d) als Referenzdichte benutzt (s. dazu auch Fußnote TABELLE 3). Der Dichteunterschied in diesem Experiment zwischen alkalisch denaturierter BrdUrd substituierter und nicht substituierter DNS beträgt $\Delta\rho$= 0,048 g x cm^{-3}.

BrdUrd/^{3}H-dThd Einbauserie beträgt dagegen 29 768 cpm/µg. Setzt man die 181 925 cpm/µg als 100% Wert fest, so sollten bei dem angebotenen 9:1 Verhältnis 10% ^{3}H-dThd, also 18 193 cpm/µg eingebaut werden. Gefunden wurden 29 786 cpm/µg, die 16,4% entsprechen. Es wurde relativ mehr ^{3}H-dThd eingebaut als erwartet (s. DISKUSSION).

Die unter den oben dargestellten Bedingungen inkubierten larvalen Speicheldrüsenpaare wurden lysiert, und die isolierte DNS in neutralen und alkalischen Cs_2SO_4, bzw. CsCl Gleichgewichts-Dichtegradienten gebandet. Sowohl die "normale" (ABB. 13a) als auch die substituierte (ABB. 13b) DNS zeigten eine monophasische Dichteverteilung. In diesem Experiment hatte die BrdUrd-substituierte DNS eine Dichte von 1,444 g x cm^{-3}, während die nicht substituierte DNS eine Dichte von 1,423 g x cm^{-3} aufwies. Die Dichtezunahme der BrdUrd-substituierten DNS gegenüber der "normalen" DNS betrug hier 0,021 g x cm^{-3}. Noch drastischer läßt sich die Dichtedifferenz in den alkalischen Cs_2SO_4 Gleichgewichts-Dichtegradienten demonstrieren. Während die alkalisch denaturierte "normale" DNS eine Dichte von 1,452 g x cm^{-3} (ABB. 13c) zeigt, ist die Dichte der substituierten DNS unter diesen Zentrifugationsbedingungen auf eine Dichte von 1,500 g x cm^{-3} (ABB. 13d) verschoben. Dies entspricht einer Dichtezunahme von 0,048 g x cm^{-3}.

Die Dichteverteilung der BrdUrd-substituierten DNS in ABB. 13d zeigt eine Asymmetrie im leichten Ast der Dichteverteilung gegenüber der Dichteverteilung der "normalen" DNS in ABB. 13c. Sie ist auf DNS-Einzelstränge mit unterschiedlich hohem Rest-Thymidinanteil in der BrdUrd-substituierten DNS zurückzuführen. Da keine überhöhte Radioaktivität in diesem Bereich festzustellen ist, handelt es sich vermutlich um Replikationsabschnitte, die schon vor der Markierung mit der Replikation begonnen hatten.

In TABELLE 3 sind die Ergebnisse einiger BrdUrd Substitutions- und Kontrollexperimente zusammengefaßt. Um einen Anhaltspunkt für den Umfang der BrdUrd-Substitution zu gewinnen, die den gemessenen Dichtezunahmen entspricht, wurde ein in dieser Hinsicht gut untersuchter Prokaryot, B. subtilis (OPARA-KUBINSKA ET AL.,

TABELLE 2: Radioaktivitätsverteilung in nicht substituierter und in BrdUrd-substituierter D.virilis Speicheldrüsen-DNS

Anzahl der Speicheldrüsenpaare	Nucleosid	Inkubations-zeit in Stdn.	Radioaktivität in cpm total	per µg DNS
50	^{3}H-dThd	4	702 346	212 832
50	^{3}H-dThd	3	373 768	113 263
100	BrdUrd/^{3}H-dThd	4	254 641	38 582
100	BrdUrd/^{3}H-dThd	4	119 570	18 117
100	BrdUrd/^{3}H-dThd	4	215 190	32 605

In TABELLE 2 sind einige typische Ergebnisse der Radioaktivitätsverteilung von "normaler", dThd enthaltender und BrdUrd-substituierter D.virilis Speicheldrüsen-DNS zusammengestellt. BrdUrd und ^{3}H-dThd (55 Ci/mmol) wurden für die Inkubation im molaren Verhältnis von 9:1 verwendet. Die Aktivitätenkonzentration im nur ^{3}H-dThd enthaltenden Inkubationsmedium betrug 125 µCi/ml und im BrdUrd/^{3}H-dThd Medium 62,5 µCi/ml. Die Molarität von BrdUrd betrug 1×10^{-5} M (s. MATERIAL UND METHODEN). Durch Aufsummierung der cpm-Werte der DNS enthaltenden Fraktionen aus den Gleichgewichts-Dichtegradienten (CsCl bzw. Cs_2SO_4) wurde der ^{3}H-dThd Einbau (Radioaktiviät in cpm, total) bestimmt. Zur Berechnung der spezifischen Aktivität der DNS wurde der Wert 0,07 µg/ Speicheldrüsenpaar benutzt (s. MATERIAL UND METHODEN).

TABELLE 3: Dichteverteilung von BrdUrd-substituierter D.virilis Speicheldrüsen-DNS in neutralen und alkalischen Cs_2SO_4 und CsCl Gleichgewichts-Dichtegradienten

	Dichte in g x cm^{-3} neutral	Dichte in g x cm^{-3} alkalisch	%dThd Substitution durch BrdUrd
Cs_2SO_4			
NN	1,423		
NB I	1,440		61
NB II	1,440		61
NB III	1,444		75
dN		1,452[a]	
dB I		1,498	
dB II		1,498	
dB III		1,500	
CsCl			
NN	1,702		
NB	1,741[b]		78
dN		1,757	
dB		> 1,830[c]	

[a] Da mir nach meinem besten Wissen keine Referenzdichte von E.coli DNS im alkalischen Cs_2SO_4 Gleichgewichts-Dichtegradienten bekannt ist, wurde diese Dichte mit einem Abbe-Refraktometer (ZEISS) mit 1,456 g x cm^{-3} bestimmt. Diese Dichte wurde einheitlich als Referenzdichte für die alkalischen Cs_2SO_4 Gleichgewichts-Dichtegradienten verwendet.

[b] Die Hauptbande mit 1,741 g x cm^{-3} hatte in diesem Experiment noch eine Schulter zur leichten Seite hin.

[c] Die Ausgangsdichte von ρ = 1,768 g x cm^{-3} hatte nicht ausgereicht, die dB-DNS zu banden. Ein Teil der dB-DNS ist bei den verwendeten Zentrifugationsbedingungen (s. MATERIAL UND METHODEN) auf den Röhrchenboden sedimentiert.

Legende zu TABELLE 3:

In TABELLE 3 sind die Dichteverteilungen von D.virilis Speicheldrüsen-DNS in neutralen und alkalischen CsCl, bzw. Cs_2SO_4 Gleichgewichts-Dichtegradienten (s. MATERIAL UND METHODEN) zusammengefaßt. NN, doppelsträngige nicht substituierte DNS; NB, Hybridmolekül bestehend aus einem "normalen" DNS-Strang und einem DNS-Strang, dessen dThd durch BrdUrd substituiert wurde (Substitution ist hier nicht vollständig, siehe Spalte zwei); dN, denaturierte nicht substituierte DNS; dB, denaturierte BrdUrd substituierte DNS. Der Prozentsatz der dThd Substitution durch BrdUrd wurde errechnet aus der Dichtedifferenz (s. auch ABB. 13) zwischen NN- und NB-DNS von D.virilis. Aufgrund der ähnlichen Basenzusammensetzung von B.subtilis (43% GC) und D.virilis (42% GC) wurden die Dichteergebnisse von B.subtilis direkt als Referenzwerte für vollständige Substitution benutzt. Für CsCl: $\rho_{NN} = 1{,}703\ g \times cm^{-3}$; $\rho_{NB} = 1{,}753\ g \times cm^{-3}$; für Cs_2SO_4: $\rho_{NN} = 1{,}424\ g \times cm^{-3}$; $\rho_{NB} = 1{,}452\ g \times cm^{-3}$ (OPARA-KUBINSKA ET AL., 1963). Es wurde die Dichtedifferenz zwischen der NN und NB DNS von B.subtilis gleich 100% gesetzt. Die 100% beziehen sich auf die vollständige Substitution von dThd durch BrdUrd im neusynthetisierten Strang des Tochterdoppelstrangs.

1963), als Referenzorganismus verwendet. B. subtilis hat eine sehr ähnliche Basenzusammensetzung (43% GC) wie D. virilis Speicheldrüsen-DNS (42% GC). Für die Bestimmung des substituierten dThd-Anteils durch BrdUrd wurde dieser Unterschied vernachlässigt. Die Dichtedifferenz von B. subtilis Hybrid-DNS[1] (ρ_{NB} = 1,452 g x cm^{-3}) und der B. subtilis "Normal"-DNS (ρ_{NN} = 1,424 g x cm^{-3}) wurde 100% gesetzt. Auf diesen Wert wurden die gefundenen Dichtedifferenzen zwischen substituierter, bzw. "normaler"DNS von D. virilis Speicheldrüsen bezogen. Die erhaltenen Substitutionswerte sind in TABELLE 3 dargestellt. Für den CsCl-Wert wurde der entsprechende CsCl-Wert von B. subtilis (OPARA-KUBINSKA ET AL., 1963) benutzt. Alle Dichteprofile waren monophasich mit Ausnahme des CsCl-Wertes (NB), der eine Schulter auf der leichten Seite zeigte. Die mittlere Substitution lag bei 69%. Der Umfang der Substitution legt ganz eindeutig nahe, daß der registrierte ^{3}H-dThd-Einbau unter den in vitro-Organkulturbedingungen (s. III.2.1., III.2.2. und MATERIAL UND METHODEN) auf semikonservative DNS-Replikation zurückzuführen ist. Der Beitrag der "repair"-DNS-Synthese zum Gesamt-^{3}H-dThd-Einbau ist zu gering, um in Erscheinung zu treten.

Da ungefähr 70% des dThd's durch BrdUrd in den neusynthetisierten Tochtersträngen substituiert werden konnte, erlaubt dieser Befund Rückschlüsse über den Umfang des endogenen dThd Syntheseblocks (s. Fußnote II.4.). Außer der 70%igen BrdUrd-Substitution wird noch ein Teil des 30%igen Rest-Thymidinanteils von radioaktivem, exogenem ^{3}H-dThd (s. oben) gestellt. Anstelle eines zu erwartenden 10%igen ^{3}H-dThd-Anteils, wurde 16,4% gefunden. Die Effektivität des DNS-Syntheseblocks unter der verwendeten FdUrd-Konzentration (ABB. 3 und MATERIAL UND METHODEN) liegt über 80%.

3. DNS · DNS in situ-Renaturierung

Gewöhnlich wird gereinigte, fraktionierte DNS in vitro mit DNS-abhängiger RNS-Polymerase von E. coli transkribiert und

---

[1] Der Thymidinanteil im neusynthetisierten Tochterstrang wurde vollständig durch BrdUrd ersetzt.

an immobilisierte, denaturierte Chromosomen hybridisiert. Diese Methode hat den Vorteil, daß man hohe spezifische Aktivitäten in der komplementären RNS erhält. Es gibt jedoch Zweifel an der Zuverlässigkeit und Symmetrie des in vitro-Transkriptionsprozesses. Zur Erhöhung der Spezifität der Hybridlokalisation wird die nicht gepaarte RNS anschließend mit RNase verdaut.

In dem hier beschriebenen System wird für die in situ-Renaturierung semikonservativ replizierte DNS verwendet. Die nicht, bzw. unspezifisch gebundenen Einzelstränge wurden mit S_1 Nuclease anschließend verdaut.

In dem in II.2. eingeführten Organkulturmedium wurde die DNS larvaler Gehirne, bzw. larvaler Speicheldrüsenpaare in vitro markiert. Die markierten Organe wurden lysiert und das Lysat über neutrale präparative CsCl Gleichgewichts-Dichtegradienten (ABB. 14 A, B und ABB. 12) gereinigt und fraktioniert (s. MATERIAL UND METHODEN). In diesen Versuchen betrug die durchschnittliche spezifische Aktivität der Gehirne-DNS 6×10^5 dpm/µg, die der Speicheldrüsen-DNS 1×10^5 dpm/µg. Die Fraktionen im neutralen CsCl Gleichgewichts-Dichtegradienten der Gehirne-DNS wurden in vier Untergruppen aufgeteilt und von jeder Untergruppe ein getrennter präparativer alkalischer CsCl Gradient gefahren (ABB. 14a-d). Auf Grund der asymmetrischen Verteilung von dG-dT, bzw. dC-dA in den Einzelsträngen der Satellitenfraktionen, erhält man in den alkalischen präparativen CsCl Gleichgewichts-Dichtegradienten eine gute Auftrennung der schweren und leichten Einzelstränge. Die Fraktionen der aufgetrennten schweren Einzelstränge H I, H II und H III wurden jeweils zusammengefaßt (durch schwarze Balken in ABB. 14b, c, d dargestellt), dialysiert, auf ungefähr 500 bp geschert und für die DNS • DNS in situ-Renaturierung vorbereitet (Einzelheiten s. STEINEMANN, 1976). H I und H II hatten eine spezifische Aktivität von 8,1 $\times 10^5$ dpm/µg und H III von 9,8 $\times 10^5$ dpm/µg[1]. Nach der in situ-

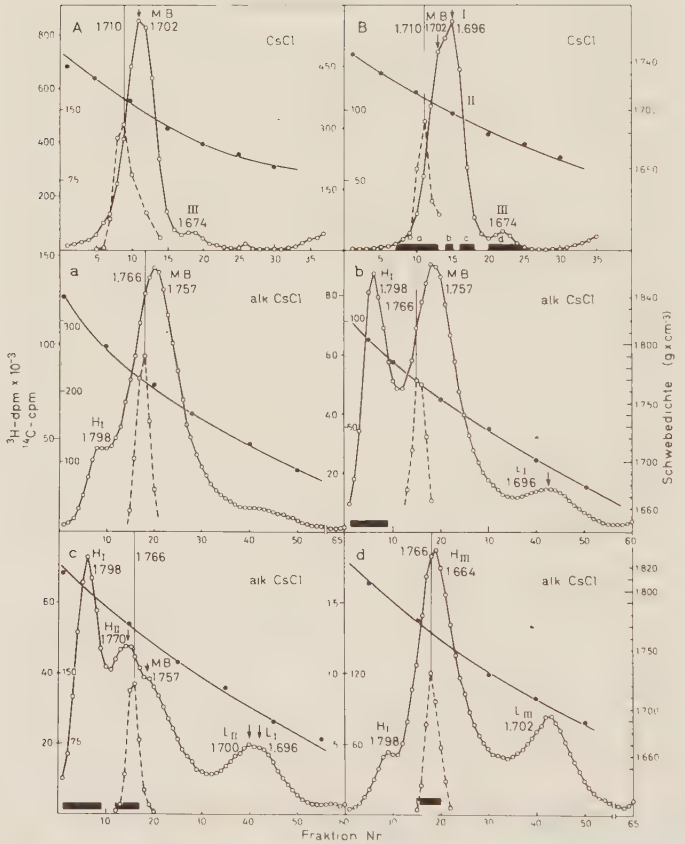
---

[1] Der gefundene Wert ist zu hoch. Dies ist auf einstreuende Hauptbandenfraktionen, welche die Radioaktivität erhöhen, jedoch in der DNS-Mengenbestimmung nicht berücksichtigt wurden, zurückzuführen. Der Wert von H III sollte dem von H II und H I entsprechen, da sein Thymidin-Anteil mit diesem identisch ist (GALL und ATHERTON, 1974).

Legende zu ABB. 14:

Dichteverteilungen markierter D.virilis Gehirne DNS in neutralen und alkalischen präparativen CsCl Gleichgewichts-Dichtegradienten.

A) 250 larvale Gehirne wurden 24 Stdn. in Medium B, erweitert um 20 µl 2 x Medium A und 20 µl ^{3}H-dThd (52 Ci/mmol, 125 µCi/ml) markiert und anschließend 6 Stdn. lysiert (s. MATERIAL und METHODEN). Als Dichtestandard wurde markierte E.coli DNS (583 cpm/µg) zugegeben. Die Zentrifugationsbedingungen waren wie in Legende zu ABB. 11 beschrieben. 150 µl Fraktionen wurden aufgefangen, 25 µl wurden jeweils auf GF 81 Glasfilter pipettiert und wie in MATERIAL und METHODEN beschrieben weiterbehandelt. Cpm-Werte wurden für Quench und Kanalüberlappung korrigiert. Die isolierte DNS hatte eine durchschnittliche spezifische Aktivität von 6 x 10^{5} dpm/µg. Die in einem Abbe-Refraktometer gemessenen Dichtewerte wurden normalisiert, so daß sich die für den Dichtestandard angegebenen Werte ergaben.
B) Die DNS enthaltenden Fraktionen von Gradient (A) wurden zusammengefaßt, zweimal durch eine 23 Gauge-Kanüle geschert, auf eine Ausgangsdichte von 1,705 g x cm^{-3} eingestellt und rezentrifugiert. 150 µl Fraktionen wurden gesammelt, jeweils 20 µl auf GF 81 Glasfilter pipettiert und gezählt. Der Gradient (B) wurde in 4 Teile (a), (b), (c) und (d) aufgeteilt (Balkenmarkierung) und von jedem ein alkalischer CsCl Gleichgewichts-Dichtegradient gefahren. Ausgangsdichte der alkalischen Gradienten war 1,740 g x cm^{-3}. Es wurden jeweils 150 µl Fraktionen gesammelt und 50 µl Aliquote auf GF 81 Filtern gezählt. Die Balken in (b), (c) und (d) geben die gesammelten Fraktionen der schweren Einzelstränge (H) an, die für die in situ DNS · DNS-Renaturierung verwendet wurden. O —— O ^{3}H-dThd markierte D.virilis DNS; O - - - - O ^{14}C markierte E.coli DNS.


A
B
CsCl
MB
1702
1710
1696
I
II
III
1674
a
b
c
d
alk CsCl
1766
1757
1798
H_I
H_{II}
H_{III}
1770
1664
L_I
L_{II}
L_{III}
1700
1702
^3H-dpm x 10^{-3}
^{14}C-cpm
Schwebedichte (g x cm^{-3})
Fraktion Nr

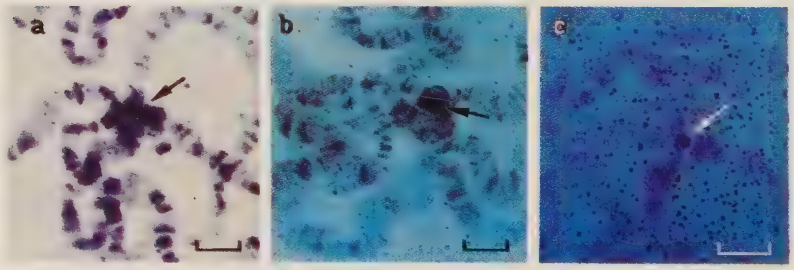

a
b
c

ABB.14

ABB.15

Legende zu ABB. 15:

Die schweren Einzelstränge H I (a), H II (b) und H III (c) wurden in situ renaturiert mit alkalisch denaturierten polytänen Speicheldrüsenkernen von D.virilis. Dargestellt sind jeweils nur die Chromozentren der polytänen Kerne. Alle 3 Satellitenfraktionen lassen sich in den Autoradiographien als distinkte Markierung im α- Heterochromatin lokalisieren. Die H I Probe (a) zeigt außerdem noch eine diffuse Markierung im proximalen β-heterochromatischen Abschnitt des X Chromosoms. Giemsa gefärbt. Maßstab 10 μm.
a) Autoradiographie der DNS • DNS in situ - Renaturierung des schweren Einzelstrangs von Satellit I (H I): spezifische Aktivität $8{,}1 \times 10^5$ dpm/μg, $1{,}4 \times 10^5$ dpm/Objektträger, 28 Tage exponiert.
b) Autoradiographie der DNS • DNS in situ-Renaturierung des schweren Einzelstrangs von Satellit II (H II): spezifische Aktivität $8{,}1 \times 10^5$ dpm/μg, 10^4 dpm/Objektträger, 91 Tage exponiert.
c) Autoradiographie der DNS • DNS in situ-Renaturierung des schweren Einzelstrangs von Satellit III (H III): spezifische Aktivität $9{,}8 \times 10^5$ dpm/μg, 1300 dpm/Objektträger, 1 Jahr exponiert.

ABB.16

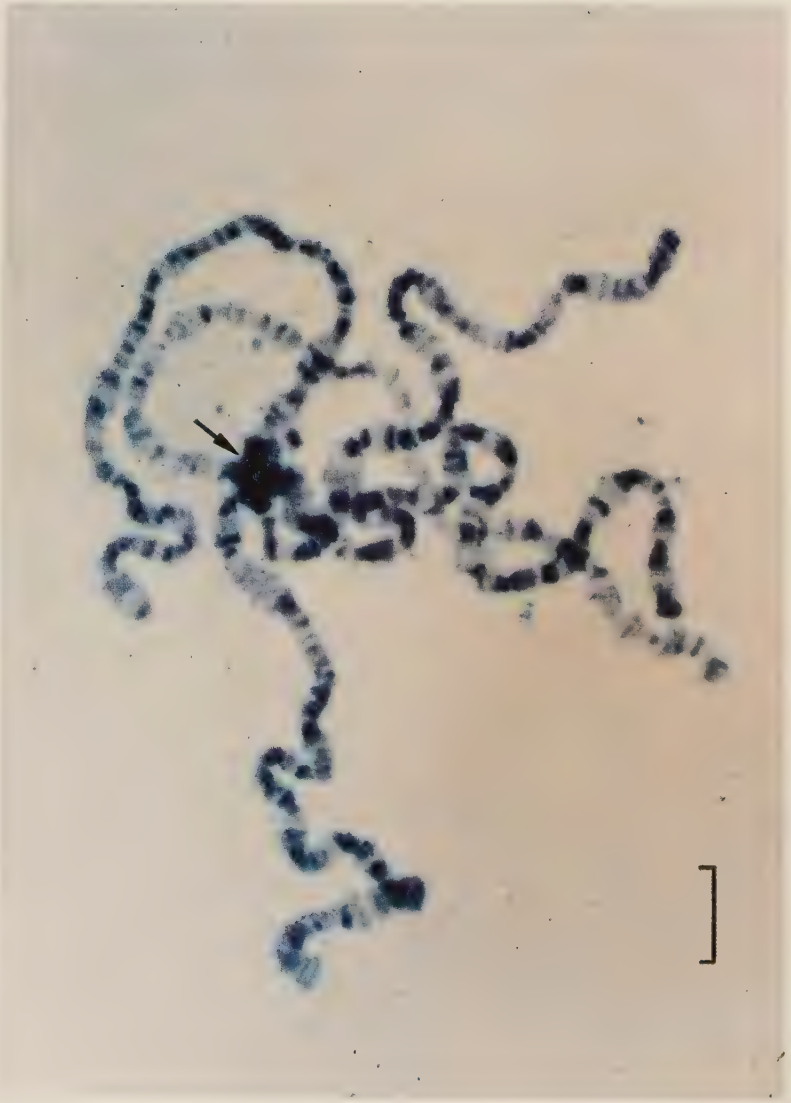


ABB.16

Legende zu ABB. 16:

Polytäner D.virilis Kern aus der in situ-Renaturierung mit H I. DNS • DNS in situ-Renaturierung und Autoradiographie wie in MATERIAL und METHODEN und Legende zu ABB. 15 a beschrieben.
Während die Riesenchromosomenarme und das β-Heterochromatin (Ausnahme proximaler Abschnitt des X Chromosoms) unmarkiert sind, zeigt das α-Heterochromatin eine distinkte Markierung.
In ABB. 15 a ist ein Ausschnitt dieses Kerns dargestellt.
28 Tage exponiert. Giemsa gefärbt. Maßstab 20 µm.

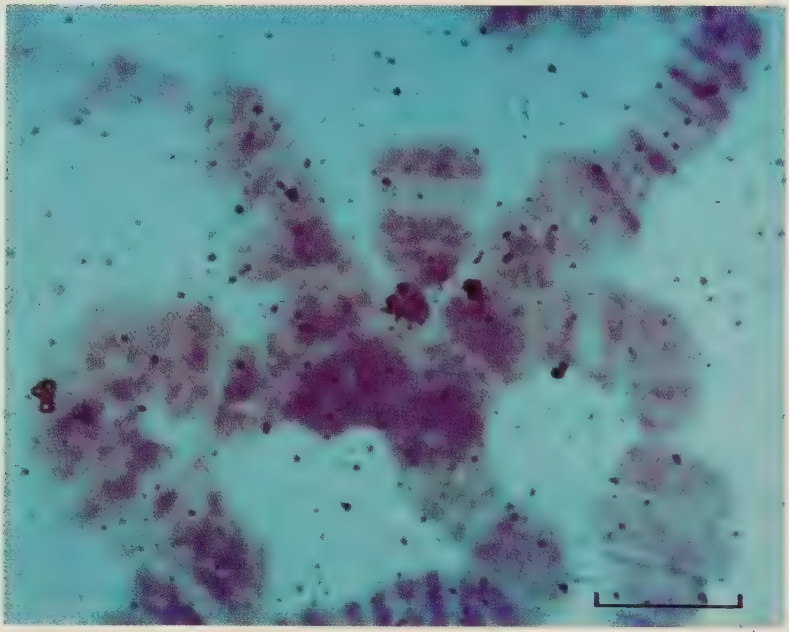


ABB.17

Legende zu ABB. 17:

H II *in situ*-Renaturierung. Im Chromozentrum des polytänen Kerns ist unter der lockeren *in situ*-Markierung deutlich das α-Heterochromatin auszumachen. Es unterscheidet sich durch seine größere Kompaktheit vom β-Heterochromatin. DNS • DNS *in situ*-Renaturierung und Autoradiographie wie in MATERIAL und METHODEN und Legende zu ABB. 15 b beschrieben. 91 Tage exponiert. Giemsa gefärbt. Maßstab 10 μm.

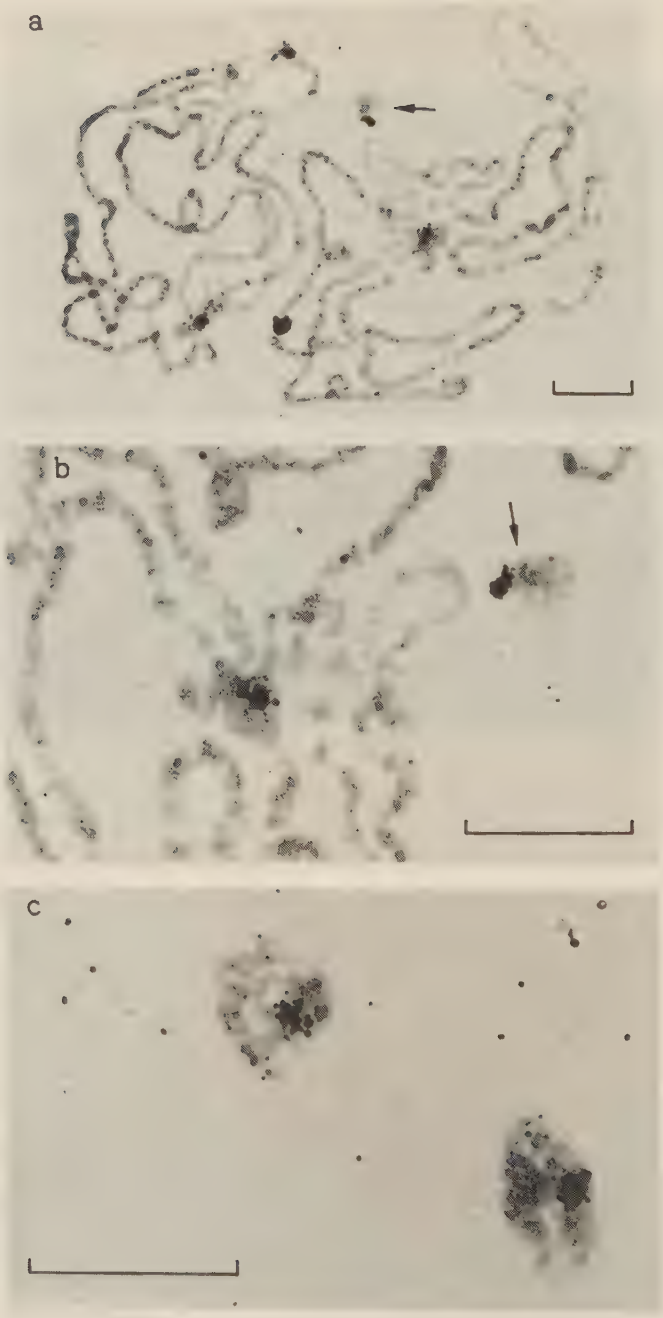


ABB.18

Legende zu ABB. 18:

H I in situ-Renaturierung (s. MATERIAL und METHODEN und Legende ABB. 15 a). Diploide Anlage-Zelle benachbart zu polytänen Speicheldrüsenkernen (a, b). Giemsa gefärbt. Maßstab 20 µm.

a) Übersicht über 3 polytäne Speicheldrüsenkerne zusammen mit einem Kern der Anlage-Zellen (Pfeil).

b) Ausschnitt aus (a). Die Markierung ist auf das α-Heterochromatin beschränkt und bedeckt sowohl im diploiden als auch im polytänen Kern eine ähnlich große Fläche (vgl.a. ABB. 6 a,b).

c) Einzeln liegende Anlage-Zellen desselben Präparats.

Renaturierung wurden die Präparate mit S_1 Nuclease verdaut. S_1 Nuclease von Aspergillus oryzae ist eine Endonuclease, die spezifisch einzelsträngige Nucleinsäuren schneidet. S_1 Nuclease-verdauung vermindert die unspezifische Hintergrundmarkierung und erhöht die Spezifität der Lokalisation der in situ-Markierung. Im Lichtmikroskop betrachtet erscheint die Morphologie der Chromosomen nach der Enzymbehandlung unverändert.

Die drei Satellitenfraktionen H I, H II und H III lassen sich als distinkte Markierung im α -Heterochromatin (s. ABB. 15a-c) lokalisieren. Dies wird in den ABBn. 15a-c, 16, 17 und 18a-c belegt. Der polytäne Kern in ABB. 16 zeigt die Spezifität der Markierung von H I bei geringer Hintergrundmarkierung (ABB. 15a ist ein Ausschnitt aus ABB. 16). Ein stark vergrößertes Chromozentrum einer H II in situ-Renaturierung ist in ABB. 17 dargestellt. In diesem schön gequetschten Chromozentrum läßt die geringe Markierung gleichzeitig auch die darunterliegende cytologische Struktur erkennen. Das α -Heterochromatin ist klar markiert. Es hat in diesem Präparat jedoch den Anschein, als ob die Markierung etwas asymmetrisch verteilt wäre und die untere Kante eine etwas stärkere Markierung zeigte. Eu- und β -Heterochromatin sind in den H I, H II und H III in situ-Renaturierungen nicht markiert, mit Ausnahme einer diffusen Markierung des proximalen β-heterochromatischen Abschnittes des X Chromosoms. Diese diffuse Markierung läßt sich jedoch nur eindeutig bei der in situ-Renaturierung mit H I nachweisen (ABB. 15a).

In den polytänen Speicheldrüsenkernen von D. virilis tritt das α -Heterochromatin im Vergleich zum β -Heterochromatin und Euchromatin stark zurück (s. ABBn. 5 und 6b). Vergleicht man die Anzahl der Silberkörner der in situ-Renaturierung der polytänen Speicheldrüsenkerne mit denen der vorwiegend diploiden Anlage-Zellen (s. ABB. 18a-c), die in einigen der Speicheldrüsen-Autoradiographien mit enthalten sind, so findet man in ihnen ähnliche Markierungsareale wie in den polytänen Kernen; d.h., die in situ-Renaturierungen der Anlage-Kerne, die 2 C, bzw. 4 C sein sollten, enthalten eine ähnliche Anzahl komplementärer Sequenzen wie die bis zu 1024 C endoreduplizierten polytänen Speicheldrüsenkerne. Diese Ergebnisse bestätigen die Befunde von GALL ET AL. (1971) und

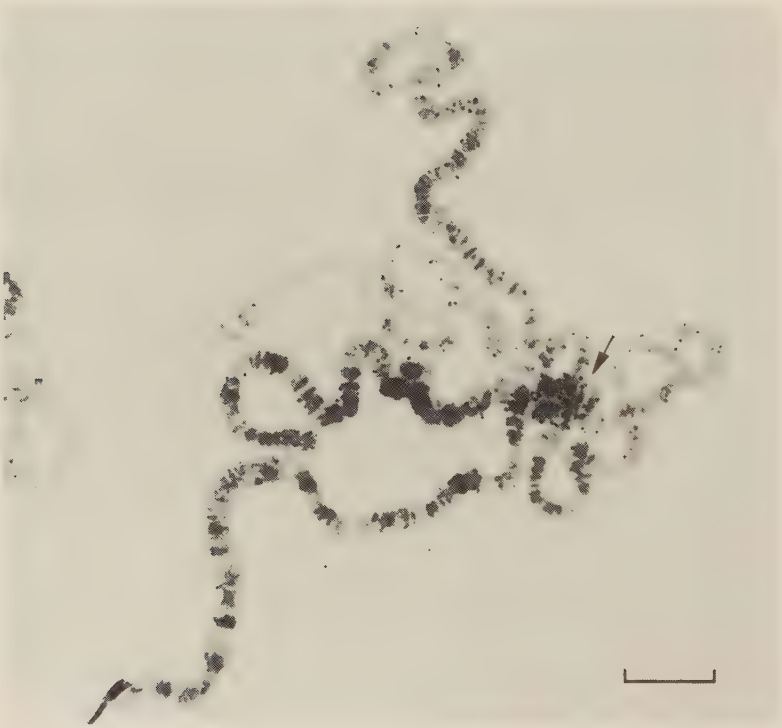


ABB.19

Legende zu ABB. 19:

In situ-Renaturierung von ^{3}H-dThd markierter *D.virilis* Speicheldrüsen-DNS. Stärkere Markierung findet sich über dem β-Heterochromatin des Chromozentrums. Die Chromosomenarme sind schwach, jedoch deutlich über dem Hintergrund markiert. Die spezifische Aktivität der Speicheldrüsen-DNS betrug 10^{5} dpm/μg. Es wurden 3 x 10^{4} cpm pro Objektträger verwendet. Die Autoradiographien wurden 6 Monate exponiert. Giemsa gefärbt. Maßstab 20 μm.

PEACOCK ET AL. (1973). Für die Charakterisierung der α-Heterochromatinstrukturen liegen somit folgende Befunde vor: (i) Übereinstimmung des Satellitenanteils (s. ABB. 7 oben) an der Gesamt-DNS von 45% mit der cytologischen Beobachtung, daß ungefähr die Hälfte des diploiden D. virilis Genoms aus α-Heterochromatin besteht (s. ABB. 4a und b); (ii) die Satellitensequenzen I, II und III lassen sich präferentiell im α-Heterochromatin lokalisieren (s. ABB. 15a-c). Diese Beobachtungen legen den Schluß nahe, daß der cytologisch als α-Heterochromatin beschriebene Chromosomenabschnitt als DNS-Struktur ausschließlich die drei Satellitensequenzen enthält.

Aus den vergleichenden CsCl Gleichgewichts-Dichtegradienten war klar ersichtlich, daß die Satellitensequenzen im Verlauf der Endoreduplikationen stark unterrepliziert sind. Fraglich war, ob in der Speicheldrüsen-DNS noch andere repetitive Sequenzen enthalten sind und wo diese lokalisiert werden können. Fraktionen alkalischer CsCl Gleichgewichts-Dichtegradienten (s. ABB. 12b), die denaturierte Speicheldrüsen-DNS von D. virilis enthielten, wurden gesammelt und für die in situ-Renaturierung wie für Gehirne beschrieben vorbereitet. Die erhaltenen Autoradiographien der in situ-Renaturierung zeigen vor allem Markierung über dem β-Heterochromatin (ABB. 19). Es muß deshalb davon ausgegangen werden, daß die größte lokale Konzentration der in der D. virilis Speicheldrüsen-DNS noch enthaltenen repetitiven Sequenzen sich im β-Heterochromatin befindet.

4. DNS-Verdopplung in diploiden und polytänen Kernen von D. virilis nach ^{3}H-dThd-Pulsmarkierung

4.1. Markierungseigenschaften der vorwiegend diploiden Zellen larvaler D. virilis Gehirne

Die in den Experimenten verwendeten larvalen Gehirne enthalten verschiedene Zellpopulationen (ABB. 2). Diese unterscheiden sich nicht nur in ihrem eigentlichen Determinations-, bzw.

Differenzierungszustand, sondern möglicherweise auch im DNS-Replikationsverhalten und im Ablauf des Zellzykluses.

4.1.1. Cytologische Analyse von Interphasekernen nach ^{3}H-dThd-Pulsmarkierung

In Interphasekernen lassen sich die mitotischen Chromosomen von D. virilis zwei unterscheidbaren Domänen zuordnen. Die eine enthält ausschließlich α-Heterochromatin (Sammelchromozentrum), die andere Euchromatin (vgl. ABB. 6a). β-Heterochromatin ist in diploiden Kernen nicht direkt zu erfassen. Nach Pulsmarkierung lassen sich in den Interphasekernen im wesentlichen folgende Markierungsmuster unterscheiden: (i) Ausschließliche, lockere Markierung im Euchromatin (ABB. 20a). Die Markierung über dem Euchromatin wächst massiv an, während das α-heterochromatische Sammelchromozentrum immer noch keine Markierung zeigt (ABB. 20b). (ii) Der gesamte Interphasekern, Eu- und α-Heterochromatin, ist markiert (ABB. 20c). (iii) Im Interphasekern ist ausschließlich das α-heterochromatische Sammelchromozentrum, bzw. ein Teil davon markiert (ABB. 20d). Nimmt man das β-Heterochromatin am Übergang vom Eu- zum α-Heterochromatin an, so läßt sich aus der Tatsache, daß bei noch lockerer Markierung des Euchromatins sich auch Markierung über dem Grenzbereich beider Domänen (Abb. 20f) finden läßt, schließen, daß das β-Heterochromatin vor dem α-Heterochromatin und möglicherweise nach dem Euchromatin zu replizieren beginnt (vgl. ABB. 24). Somit ergeben sich drei Hauptmuster: Nur Euchromatinmarkierung, gemeinsame Markierung des Eu- und α-Heterochromatins (Totalmarkierung) und nur α-Heterochromatinmarkierung. Bei der Analyse der Markierungsmuster fiel auf, daß in einigen Zellarealen alle markierten Zellen dem gleichen Markierungstyp angehören; z.B. fast ausschließliche Markierung der Sammelchromozentren (ABB. 20e). Aus diesem Befund läßt sich ableiten, daß einzelne, kleinere Zellgruppen synchron replizieren.

Legende zu ABB. 20:

Markierungsmuster nach ^{3}H-dThd-Pulsmarkierung in Interphasekernen aus D.virilis Gehirnen. Gehirne von D.virilis wurden für 10 Minuten mit ^{3}H-dThd (60,8 Ci/mmol, 250 µCi/ml) pulsmarkiert. Die verwendeten Präparate gehören der Kontrollserie (t = o) des Markierte-Mitosen-Versuchs an. Expositionszeit 16 Tage. Giemsa gefärbt. Maßstab 10 µm.

a) Nur Euchromatin locker markiert.

b) Dichte Markierung des Euchromatins. Das α-Heterochromatin (Pfeil) ist noch nicht markiert (nur Euchromatin).

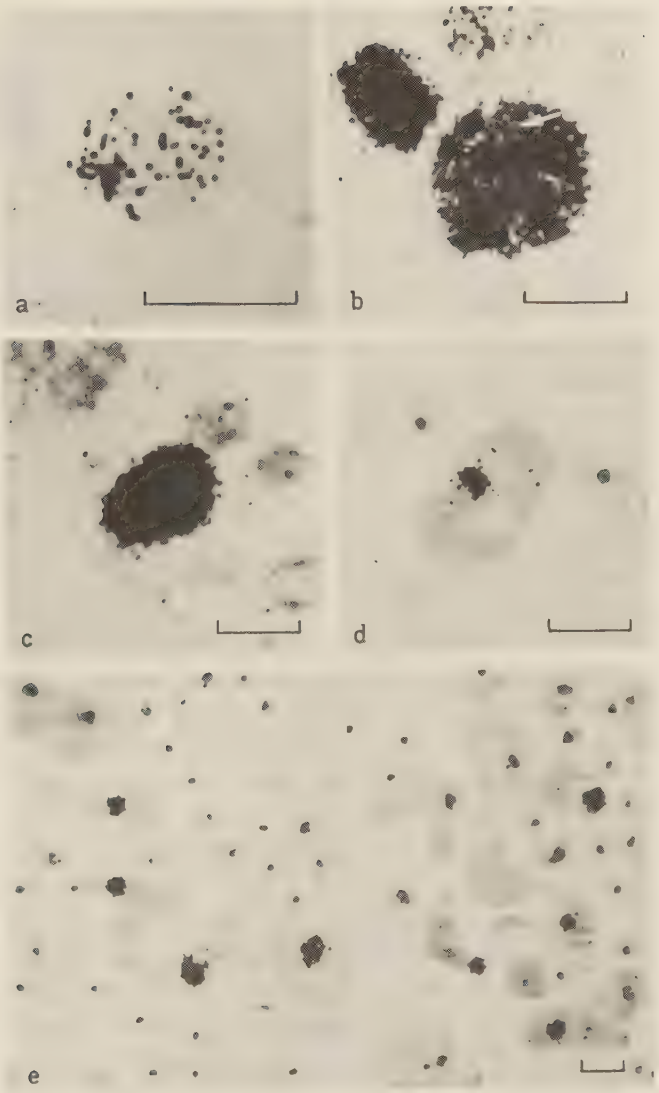
c) Kontinuierlich markierter Kern (Eu- und Heterochromatin ist markiert).

d) Ausschließliche Markierung des α-Heterochromatins (nur α-Heterochromatin). Nur ein Teil des Heterochromatins zeigt noch Markierung (s.a. ABB. 21).

e) Gruppe synchron replizierender Zellen. Alle markierten Zellen dieses Bildausschnittes zeigen fast ausschließlich Markierung im α-Heterochromatin.

f) Der Übergang zum α-Heterochromatin und das Euchromatin zeigen Markierung. In der Übergangsregion ist das β-Heterochromatin zu vermuten.

f') wie (f). Silberkörnchen entfernt (s. MATERIAL und METHODEN).


a
b
c
d
e

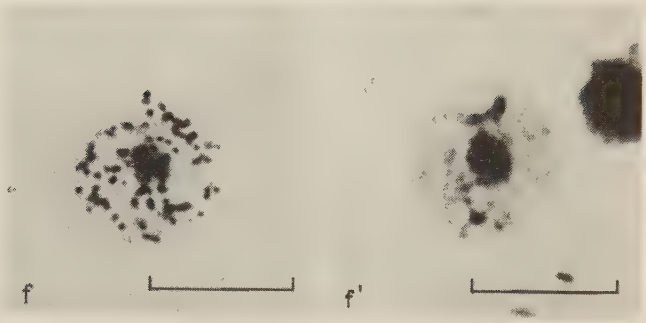


ABB.20

4.1.2. Markierungsindex (M.I.) nach ^{3}H-dThd-Pulsmarkierung

Durch willkürliche Rastereinstellung wurde die Markierungshäufigkeit (Markierungsindex, M.I.) der Gehirnzellen in den Kontroll-Autoradiographien (t = o) bestimmt (s. MATERIAL UND METHODEN, II.8.). Zählt man alle Zellen unabhängig von ihrer Größe aus, so ergibt sich die Markierungshäufigkeit, die in TABELLE 4 dargestellt ist. Der Markierungsindex beträgt 0,25 $\pm$ 1,2%. Wie schon erwähnt, könnten die untersuchten proliferierenden Zellpopulationen heterogen sein. Zunächst wurden die Zellen grob in kleine und große eingeteilt; die kleinen Zellen besitzen kleine runde Kerne, mit kondensiertem Chromatin. Diese Eigenschaft macht sie untauglich für eine Feinanalyse der Markierungsmuster. Die großen Zellen dagegen besitzen große, meist ovale Zellkerne mit aufgelockertem Chromatin (vgl. ABB. 20e). Nur diese Zellpopulation wurde für die Analyse der Markierungsmuster (TABELLE 7) herangezogen. Wie sich zeigte, war die Markierungshäufigkeit der großen Zellen höher als die der gesamten Zellpopulation (TABELLE 5). Der M.I. beträgt für große Zellen 0,36 $\pm$ 1,4%. Für die kleinen Zellen wurde er mit 0,14 $\pm$ 1,4% bestimmt (s. TABELLE 6). Unterwirft man die Ergebnisse aus TABELLE 5 (große Zellen) und TABELLE 6 (kleine Zellen) einem Homogenitätstest, so ergibt sich keine Homogenität; d.h., kleine und große Zellen zeigen signifikant verschiedene Markierungshäufigkeiten (Signifikanzniveau α = 0,05). Eine histologische Charakterisierung der kleinen bzw. großen Zellen war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

Die Markierungsverteilung in den Interphasekernen der großen Zellen ist in TABELLE 7 dargestellt. Das weitaus häufigste Muster zeigt Markierung sowohl über dem Eu- als auch dem α-Heterochromatin (89,4%). Wesentlich weniger häufig ist die Markierung nur über α-Heterochromatin (9,3%). Markierung nur über Euchromatin ist selten. Allerdings könnte der Wert für Markierung nur über Euchromatin (1,3%) etwas unterschätzt sein, da die cytologische Situation die sichere Erkennung von unmarkiertem α-Heterochromatin erschwert (s. ABB. 20b).

TABELLE 4: Markierungshäufigkeit nach ^{3}H-dThd-Pulsmarkierung in Gehirnen des 3. Larvenstadiums von D.virilis

Klasse	Häufigkeit
nicht markierte Zellen	1 059 (75%)
markierte Zellen	343 (25%)
Summe	1 402 (100%)

TABELLE 5: Markierungshäufigkeit nach ^{3}H-dThd-Pulsmarkierung der großen Zellen in Gehirnen des 3. Larvenstadiums von D.virilis

Klasse	Häufigkeit
nicht markierte Zellen	802 (64%)
markierte Zellen	451 (36%)
Summe	1 253 (100%)

TABELLE 6: Markierungshäufigkeit nach ^{3}H-dThd-Pulsmarkierung der kleinen Zellen in Gehirnen des 3. Larvenstadiums von D.virilis

Klasse	Häufigkeit
nicht markierte Zellen	541 (86%)
markierte Zellen	91 (14%)
Summe	632 (100%)

Legende zu TABELLE 4:

Herauspräparierte Gehirne wurden für 10 Minuten mit ^{3}H-dThd (60,8 Ci/mmol;250 µCi/ml) pulsmarkiert und für die Autoradiographie vorbereitet (s. MATERIAL UND METHODEN, II. 8.). Die hier verwendeten Objektträger sind der t=o Kontrolle für markierte Mitosen entnommen.
Insgesamt wurden 8 Raster auf den Objektträgern O/3 und O/4 ausgezählt. Die erhaltenen Stichproben von O/3 und O/4 erwiesen sich als homogen (χ^2-Test) und wurden vereinigt. Es ergab sich bei α = 0,05 keine Signifikanz. Pro Raster wurden 175 $\pm$ 23 Zellen gezählt.

Legende zu TABELLE 5:

Objektträger derselben Versuchsserie wie TABELLE 4 wurden auf die Markierungshäufigkeiten der nur großen Zellen untersucht (s. Text).
Insgesamt wurden 17 Raster der Ojektträger O/2 und O/4 ausgezählt. Die erhaltenen Stichproben aus O/2 und O/4 erwiesen sich als homogen (χ^2-Test) und wurden vereinigt. Es ergab sich bei α = 0,05 keine Signifikanz. Pro Raster wurden 74 $\pm$ 21 Zellen gezählt.

Legende zu TABELLE 6:

Insgesamt wurden 20 Raster der Objektträger O/2 und O/4 ausgezählt. Die erhaltenen Stichproben aus O/2 und O/4 erwiesen sich als homogen (χ^2-Test) und wurden vereinigt. Es ergab sich beiα = 0,05 keine Signifikanz. Pro Raster wurden 30 $\pm$ 12 Zellen gezählt.

TABELLE 7: Markierungsverteilung über dem Chromatin von Interphasekernen nach ^{3}H-dThd-Pulsmarkierung der großen Zellen in Gehirnen des 3. Larvenstadiums von D.virilis

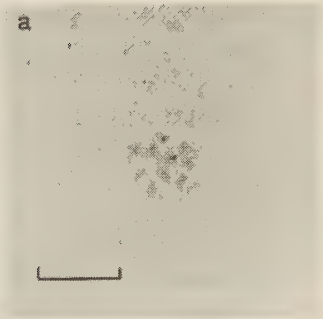
Klasse	Häufigkeit
Markierung über nur α-Heterochromatin	42 (9,3%)
Markierung über Eu- und α-Heterochromatin	403 (89,4%)
Markierung über nur Euchromatin	6 (1,3%)
Summe	451 (100%)

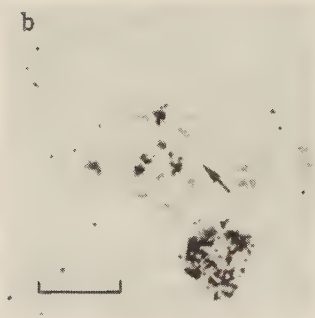
Vor der Vereinigung der jeweiligen Häufigkeitsverteilungen der Objektträger 0/2 und 0/4 wurden die Werte auf Homogenität (χ^2-Test) geprüft. Es ergab sich bei α =0,05 keine Signifikanz.

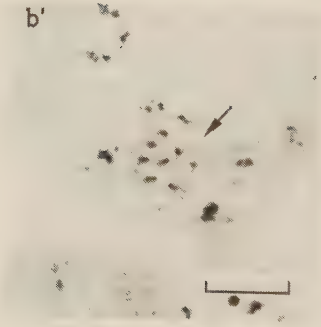
4.1.3. Cytologische Analyse mitotischer Chromosomen nach ^{3}H-dThd-Pulsmarkierung

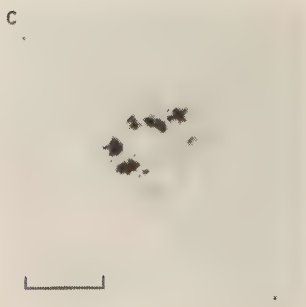
Um die Markierungsmuster nicht nur intern gegeneinander abzugrenzen, sondern sie in den Verlauf der S-Phase einzuordnen, wird ein zeitlicher Parameter in der Musterabfolge benötigt. Erfolgt die Pulsmarkierung durch kurzzeitiges Anbieten von ^{3}H-dThd und nachfolgendem Austausch der markierten Vorstufe durch relativ hohe Konzentrationen an unmarkiertem Thymidin, so verbleiben die Zellen weiterhin im Zellzyklus. Fixiert man nun die Zellen in bestimmten Zeitintervallen nach der Pulsmarkierung und benutzt das Eintreffen der Zellen in der Mitose als "Zeitnahme", so erhält man den gewünschten Zeitparameter, der sich mit den gefundenen Markierungsmustern korrelieren läßt. Die "Blickrichtung" durch das "Mitosenfenster" ist entgegen dem Verlauf des Zellzyklus gerichtet; d.h., die ersten markierten Metaphasen, die in die Mitose einlaufen, wurden von dem ^{3}H-dThd Kurzpuls am Ende der S-Phase erfaßt.

Eine Stunde nach Beendigung des Kurzpulses tauchen die ersten markierten Metaphasen auf. Diese Markierungen finden sich ausschließlich im α-Heterochromatin. Alle markierten Metaphasen bis zum Zeitwert 3 Stdn. zeigen diese Markierung (ABB. 21a-d und s.a. TABELLE 10). Gegen Ende der S-Phase repliziert also nur noch das α-Heterochromatin. Die genaue Betrachtung zeigt, daß die α-Heterochromatindomänen der einzelnen Metaphasechromosomen ihre Replikation unterschiedlich beenden (ABB. 21a-d). Nach einer Markierungsphase, in der alle α-Heterochromatindomänen markiert sind (ABB. 21d), findet man zum Beispiel folgendes Markierungsmuster (ABB. 21c): Ein Chromosom ist unmarkiert (möglicherweise das X Chromosom); ein Chromosomenpaar ist sehr schwach im α-Heterochromatin, eines schwach markiert; zwei Chromosomenpaare zeigen starke Markierung im α-Heterochromatin; ein Chromosom (vermutlich das Y Chromosom) besitzt einen Markierungsblock im proximalen Bereich. Eine weitergehende Markierungseinschränkung auf nur noch zwei markierte Chromosomenpaare zeigt die Metaphaseplatte in ABB. 21b. In dieser Metaphaseplatte ist das VI. Chromosomenpaar erkennbar; es gehört zu den unmarkierten Paaren. Jedoch schon in

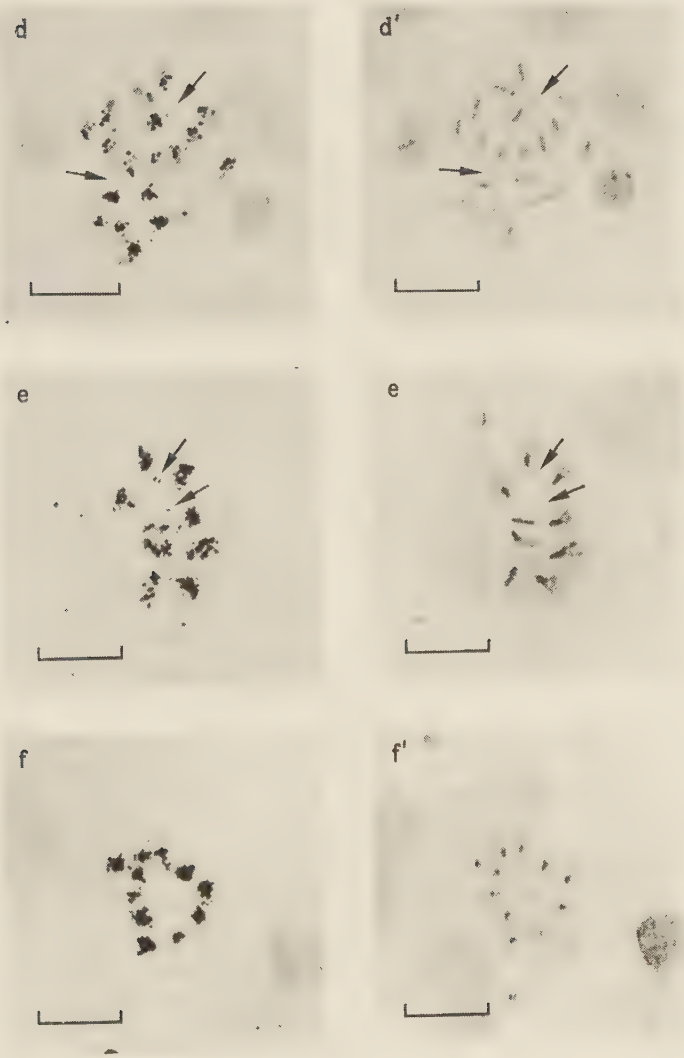

a


b


b'


c

c'


d
d'
e
e
f
f'

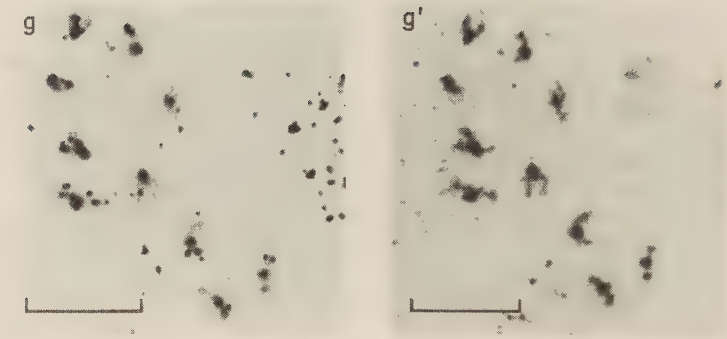


ABB.21

Legende zu ABB. 21:

^{3}H-dThd pulsmarkierte Metaphasenplatten aus larvalen D.virilis Gehirnen. Die Anordnung der Metaphasen erfolgte aus der "Blickrichtung" vom "Mitosefenster" (s. Text). In (b') - (g') wurden die Silberkörnchen entfernt (s. MATERIAL und METHODEN). Die Autoradiographien wurden 16 Tage exponiert. Giemsa gefärbt. Maßstab 10 µm.

a) Ein Chromosomenpaar ist schwach im α-Heterochromatin markiert.

b) Zwei Chromosomenpaare sind im α-Heterochromatin markiert. Das punktförmige Chromosomenpaar VI ist unmarkiert (Pfeil).

c) Ein Chromosomenpaar ist sehr schwach, eines schwach markiert. Zwei Chromosomenpaare zeigen starke Markierung. Das Chromosom in 12 Uhr Position, vermutlich das Y Chromosom, trägt einen proximalen Markierungsblock (s.a. e). Ein Chromosom (bei 6 Uhr), vermutlich das X Chromosom, ist unmarkiert.

d) Frühe Anaphase. Die Tochterchromosomen sind getrennt. Das α-Heterochromatin hebt sich nicht mehr so kontrastreich vom Euchromatin ab. Fast alle Markierungen der kreisförmig angeordneten Chromosomen weisen zur Mitte. Das punktförmige Chromosomenpaar VI ist unmarkiert (Pfeile).

e) Alle Chromosomen sind mit unterschiedlicher Intensität markiert, auch das punktförmige Chromosomenpaar VI (Pfeile). Das Chromosom in Position 7 Uhr z.B. zeigt über dem Euchromatin aufgelockerte Markierung. Das vermutliche Y Chromosom (Mitte) ist in der Mitte unmarkiert und trägt an beiden Enden jeweils einen Markierungsblock. Der Metaphaseplatte fehlt ein Chromosom.

f) Alle Chromosomen der Metaphaseplatte sind in Eu- und Heterochromatin markiert (kontinuierliche Markierung).

g) Ausschließliche Markierung in den euchromatischen Chromosomenhälften.

der zeitlich davor liegenden Metaphaseplatte der ABB. 21dist das VI. Chromosom nicht mehr markiert; d.h., das VI. Chromosom beendet als erstes seine Verdopplung. Bis zur Markierung nur eines Chromosomenpaares läßt sich die asynchrone Beendigung der α-Heterochromatinverdopplung zurückverfolgen (ABB. 21a). Die der ausschließlichen α-Heterochromatinmarkierung vorangehenden Muster lassen sich aufgliedern in ein Übergangsmuster (ABB. 21e), Totalmarkierung (ABB. 21f) - Eu- und Heterochromatin sind gemeinsam markiert - und ausschließliche Markierung im Euchromatin. ABB. 21a-g vermittelt das Spektrum der Verdopplungszustände des diploiden Karyotyps von D. virilis vom Ende (ABB. 21a) bis zum Beginn (ABB. 21g) der S-Phase. Bemerkenswert ist die asynchrone Beendigung der Replikation in den jeweiligen α-Heterochromatinhälften.

4.1.4. S-Phasenlänge einer proliferierenden Zellpopulation in D. virilis Gehirnen

Die "Markierte-Mitosen-Technik" (QUASTLER und SHERMAN, 1959) basiert auf folgendem Prinzip: Eine Gruppe von Zellen wird innerhalb einer asynchronen Zellpopulation durch ^{3}H-dThd-Pulsmarkierung gekennzeichnet. Das gemeinsame Gruppenmerkmal ist die DNS-Synthese zum Zeitpunkt der Pulsmarkierung. Experimentell untersucht wird das Eintreffen der gekennzeichneten Zellen in die Metaphase. Mit dieser Methode läßt sich der Durchlauf einer Zellgruppe durch den Mitosezyklus verfolgen. Ergibt sich ein klarer Gipfel in der "Markierten-Mitose-Kurve" - es wird der Quotient aus markierten Mitosen (n_{M^*}) und der Gesamtzahl der Mitosen (n_M) gegen die Zeit nach Gabe des Kurzpulses aufgetragen -, so zeigt dies, daß die Zellgruppe innerhalb der getesteten Zeit ihre Synchronität nicht verloren hat. Für diese Zellgruppe lassen sich aus der "Markierten-Mitosen-Kurve" Zeitparameter für die intermitotischen Abschnitte G_1, S und G_2 (HOWARD und PELC, 1953) ableiten.

In TABELLE 8 sind die erhaltenen Häufigkeitsverteilungen der markierten Mitosen nach ^{3}H-dThd-Pulsmarkierung zusammengestellt. Die experimentellen Werte wurden mit einem für die Auswertung von

TABELLE 8: Häufigkeitsverteilung markierter Mitosen nach ^{3}H-dThd-Pulsmarkierung in Gehirnen des 3. Larvenstadiums von D.virilis

	Zeit nach Pulsmarkierung (Stdn.)															
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	13	14	16	20
Markierte Mitosen n_M*		4	2	3	21	43	55	17	18	20	103	18	56	6	51	30
Nicht markierte Mitosen	82	195	23	74	61	43	44	18	9	5	25	2	12	3	30	36
Summe der untersuchten Mitosen n_M	82	199	25	77	82	86	99	35	27	25	128	20	68	9	81	66
Mitosen Index n_M*/n_M (%)		2,0	8,0	3,9	25,6	50,0	55,6	48,6	66,7	80,0	80,4	90,0	82,4	66,7	63,0	45,5

Larvale Gehirne (3. Larvenstadium) wurden für 10 Minuten mit ^{3}H-dThd (60,8 Ci/mmol, 250 µCi/ml) in einem Organkultur-Medium pulsmarkiert (s. MATERIAL UND METHODEN, II.8.). Nach dem Abstoppen der Inkubation im Eisbad (t=0) und nachfolgendem Waschen in Medium A, wurden die Gehirne für t=1, 2, 3, etc. Stunden in einem Medium, das unmarkiertes Thymidin (12,1 µg/ml) enthielt, inkubiert und anschließend für die Autoradiographie vorbereitet (s. MATERIAL UND METHODEN). Die Ergebnisse aller Objektträger einer Zeitserie wurden vereinigt.

TABELLE 9: Computer-optimierte Mitosen-Parameter der TABELLE 8

	Zeit nach Pulsmarkierung (Stdn.)																		
	1,5	2,5	3,5	4,5	5,5	6,5	7,5	8,5	9,5	10,5	11,5	12,5	13,5	14,5	15,5	16,5	17,5	18,5	19,5	20,5
Mitosen Index n_M^*/n_M(%)	0,3	4,9	15,7	28,3	44,1	55,9	65,9	73,4	79,2	80,3	82,1	80,5	76,2	71,4	66,8	58,7	50,2	43,3	36,3	31,4

Die in TABELLE 8 zusammengefaßten Ergebnisse wurden mit einem für die Auswertung von markierten Mitosendaten entwickelten Programm optimiert.

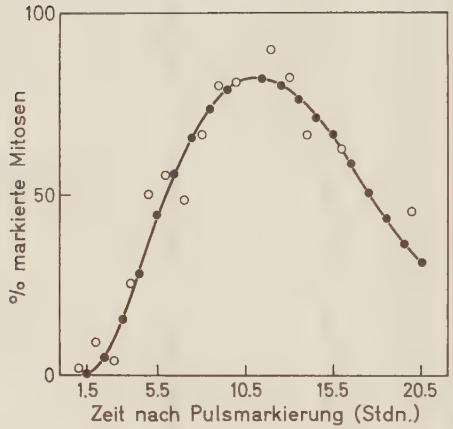

100
50
0
% markierte Mitosen
1.5
5.5
10.5
15.5
20.5
Zeit nach Pulsmarkierung (Stdn.)

ABB.22

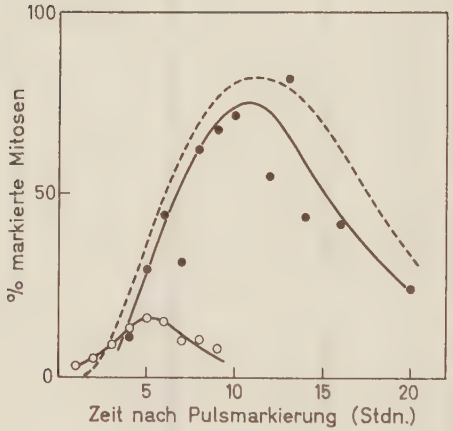

100
50
0
% markierte Mitosen
5
10
15
20
Zeit nach Pulsmarkierung (Stdn.)

ABB.23

Legende zu ABB. 22:

"Markierte-Mitosen-Kurve" einer Zellpopulation aus *D.virilis* Gehirnen. t_s = 11,9 ± 4,3 Stdn. und $t_{(G_2 + 1/2M)}$ = 6,9 ± 3,8 Stdn. . o experimentell erhaltene Werte (TABELLE 8); • Computer optimierte Werte (TABELLE 9).

Legende zu ABB. 23:

Verteilung der nur im α-Heterochromatin (n_{M^*H}), bzw. der in α-Heterochromatin und Euchromatin (n_{M^*E+H}) markierten Metaphasenplatten in Abhängigkeit von der Zeit nach Pulsmarkierung. - - - Computer-optimierter Kurvenverlauf der "Markierte-Mitosen-Kurve" (s. TABELLE 9 und ABB. 22).
o —— o Prozentsatz der Mitosen mit nur α-Heterochromatinmarkierung (n_{M^*H}/n_M in %). Aufgetragen sind die Schwerpunkte, die nach dem Verfahren der gleitenden Durchschnitte aus den experimentellen Werten ermittelt wurden (TABELLE 10).
• —— • Prozentsatz der Mitosen mit Eu- und α-Heterochromatinmarkierung (n_{M^*E+H}/n_M in %). Aufgetragen sind die experimentell gefundenen Werte.

Markierte-Mitosen-Daten entwickelten Computerprogramm (Dr. G. STFEL, Institute of Cancer Research, London) optimiert (TABELLE 9). An Hand der Werte von TABELLE 9 wurde die Markierte-Mitosen-Kurve angefertigt (ABB. 22). Die Werte der Untersuchung sind ausreichend, um statistisch gesichert die Dauer der S-Phase (t_s) und G_2-Phase ($t_{G2 + {}^1/_{2M}}$) zu bestimmen. Die S-Phasenlänge der untersuchten Zellpopulation in D. virilis Gehirnen beträgt t_s = 11,9 Stdn. ± 4,3 (Mittelwert), bzw. 11,2 Stdn. (Medianwert); die G_2-Phasenlänge, $t_{G2 + {}^1/_{2M}}$ wurde mit 6,9 Stdn. ± 3,8 (Mittelwert), bzw. 6,0 Stdn. (Medianwert) bestimmt. Die Zellzyklusdauer (t_c) und G_1-Phasenlänge (t_{G1}) sind durch die experimentellen Daten der Markierten-Mitosen-Kurve nicht definierbar.

Vorausgesetzt jedoch, die untersuchten Gehirnzellen stellen eine exponentiell proliferierende Zellpopulation dar, d.h., wenn jede dieser Zellen sich wieder teilt, so läßt sich mit dem Markierungsindex und der Kenntnis der S-Phasenlänge aus der Beziehung $M.I. = \ln 2 \cdot \frac{t_s}{t_c}$ mit M.I. = 0,36 (große Zellen und t_s = 11, 9 Stdn., die t_c Zellzyklusdauer errechnen. Löst man den Ausdruck nach t_c auf und setzt die Werte für M.I. und t_s ein, so beträgt unter diesen Voraussetzungen die Zellzyklusdauer 22,9 Stdn. und für t_{G1} ergäbe sich zwangsläufig 4,1 Stdn. . Der Zellzyklus, der durch den ^{3}H-dThd-Kurzpuls gekennzeichneten Zellpopulation in D. virilis setzt sich so zusammen: G_1: 4,1 Stdn. (unter der Annahme, daß eine exponentiell proliferierende Zellpopulation vorliegt); S:11,9 Stdn. und $G_{2 + {}^1/_{2M}}$: 6,9 Stdn. .

4.1.5. Markierungsverteilung über den Metaphasechromosomen nach ^{3}H-dThd-Pulsmarkierung korreliert mit dem zeitlichen Eintritt in die Mitose

Die markierten Metaphasen der einzelnen Zeitwerte (TABELLE 8) wurden auf ihre Markierungsmuster hin untersucht: Markierung nur über α-Heterochromatin (n^*_{MH}), Markierung über Eu- und α-Heterochromatin ($n^*_{ME + H}$) und Markierung nur über Euchromatin (n^*_{ME}). Die Befunde sind in TABELLE 10 dargestellt. Sie verdeutlicht nochmals die qualitativen Befunde der vorausgegangenen

TABELLE 10: Markierungsverteilung nach ^{3}H-dThd-Pulsmarkierung auf den Metaphasechromosomen von D.virilis, angeordnet in der zeitlichen Reihenfolge ihres Eintretens in die Mitose

	Zeit nach Pulsmarkierung (Stdn.)																Zeilen-summe
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	13	14	16	20	
Markierung über nur Heterochromatin n_{M^*H}		4 (2%)	2 (8%)	3 (4%)	12 (15%)	18 (21%)	11 (11%)	5 (14%)	1 (4%)	3 (12%)	9 (7%)						68 (15%)
Markierung über Eu- und Heterochromatin n_{M^*E+H}					9 (11%)	25 (29%)	44 (44%)	11 (31%)	17 (63%)	17 (68%)	94 (72%)	11 (55%)	56 (82%)	4 (44%)	34 (42%)	16 (24%)	338 (76%)
Markierung über nur Euchromatin n_{M^*E}								1 (3%)				7 (35%)		2 (22%)	17 (21%)	14 (21%)	41 (9%)
Summe		4	2	3	21	43	55	17	18	20	103	18	56	6	51	30	447 (100%

Die Zeile "markierte Mitosen" der in TABELLE 8 summarisch dargestellten Ergebnisse ist in 3 Markierungstypen s.a. TABELLE 7) aufgeschlüsselt. Die in Klammern angegebenen Werte in den Stundenkolonnen stellen den Quotienten aus der Anzahl spezifisch markierter Mitosen und der Gesamtzahl der Mitosen (n_{M^*H}/n_M, n_{M^*E+H}/n_M und n_{M^*E}/n_M) in Prozent dar. Die Zeilensummen repräsentieren die Gesamtmarkierungsverteilung untersucht an Metaphasenchromosomen eines 10minütigen Kurzpulses (vgl. mit TABELLE 7).

Abschnitte.

Die drei gefundenen Markierungsmuster lassen sich drei zeitlich abgrenzbaren Abschnitten der S-Phase zuordnen. Zu Beginn der S-Phase repliziert nur das Euchromatin (s. TABELLE 10 und ABB. 20a,b). Die quantitative Erfassung der Werte war jedoch mit Schwierigkeiten verbunden. Nach der langen Inkubation streuten die erhaltenen Werte zu stark, um eine auch nur annähernd genaue Aussage über die Dauer dieses Abschnittes aus TABELLE 10 abzuleiten. Vernachlässigt man die eine Beobachtung 7 Stdn. nach der Pulsmarkierung (TABELLE 10, 3. Zeile), dann treten die ersten nur in Euchromatin markierten Metaphasen ab der 12. Std. nach Pulsmarkierung auf. Dieser Zeitpunkt ist in vernünftiger Übereinstimmung mit dem Beginn der S-Phase.

Besonders interessant war jedoch in dieser Untersuchung das Replikationsverhalten des α-Heterochromatins (ABB. 23). Das Zeitintervall zwischen dem 50% Wert des ansteigenden und dem 50% Wert des absteigenden Astes der Häufigkeitsverteilung beträgt 5 Stdn..Da der Kurvenverlauf jedoch stark abgeflacht ist, dürfte dieser Wert überhöht sein; d.h., er läßt sich als obere Abschätzung für die Dauer der ausschließlichen α-Heterochromatinmarkierung verwenden.

Die Phase der gleichzeitigen Markierung von α-Heterochromatin und Euchromatin (ABB. 23) umfaßt den längsten Zeitabschnitt. Nach dem oben geschilderten Verfahren erhält man für die Replikation von Euchromatin und α-Heterochromatin ungefähr 10 Stdn..Da die Summe beider Werte größer ist als die Dauer der S-Phase, muß einer der beiden Werte oder müssen beide Werte überschätzt sein.

Verwendet man die Markierungsprozentsätze der Spalte "Zeilensumme" in TABELLE 10 und setzt 100% gleich der S-Phasenlänge von 11,9 Stdn., so lassen sich die Prozentsätze der Markierung in Stundenanteile umrechnen. Für nur α-Heterochromatin ergibt sich ungefähr 2 Stdn., für Eu- und α-Heterochromatin ungefähr 9 Stdn. und für nur Euchromatin ungefähr 1 Std..Die Werte der Interphasekerne-Markierungsmuster aus TABELLE 7 auf die S-Phasenlänge umgerechnet, ergeben für nur α-Heterochromatin und für nur Euchromatin noch geringere Werte, dagegen für Eu- und α-Heterochromatin

einen größeren Wert. Letztere lassen sich durch eine mögliche Unterschätzung der Euchromatinmarkierung (s. III.4.1.2.) erklären.

Berücksichtigt man beide Befunde (Zeitintervall der 50% Werte in der Graphik und Markierungsprozentsätze), so sollte die nur α-Heterochromatinmarkierung 2 - 5 Stdn. umfassen, Eu- und α-Heterochromatin weniger als 10 Stdn. und nur Euchromatin ungefähr 1 Std. (s. DISKUSSION).

4.2. Markierungseigenschaften der Riesenchromosomen in den larvalen Speicheldrüsen von D. virilis

Die Riesenchromosomen der Dipteren zeigen nach ^{3}H-dThd-Pulsmarkierung zwei auffallende Grundmarkierungstypen: "kontinuierlich" und "diskontinuierlich". Das kontinuierliche Markierungsmuster ist durch gleichzeitigen und gleichmäßigen ^{3}H-dThd-Einbau über dem gesamten Riesenchromosomenkomplement charakterisiert. Als diskontinuierlich werden Markierungsmuster eingestuft, bei denen diskrete Abschnitte, die eine oder mehrere Banden umfassen können, mit unmarkierten Abschnitten abwechseln. Das kontinuierliche und die verschiedenen diskontinuierlichen Markierungsmuster entsprechen DNS-Replikationszuständen, die alle während eines Verdopplungsschrittes durchlaufen werden (KEYL und PELLING, 1963). Bei Sciara fand GABRUSEWYCZ-GARCIA (1964) erstmals zwei komplementäre diskontinuierliche Markierungsmuster. Da beide Muster das kontinuierliche Muster überlappen, ergibt sich für Sciara coprophila folgende, wahrscheinliche zeitliche Reihenfolge: Diskontinuierlich I[1] -kontinuierlich - diskontinuierlich II. Während alle älteren Autoren bei Chironomus und Drosophila nur das Muster"diskontinuierlich II" gefunden haben, fand HÄGELE (1970) bei Chironomus und später auch bei D. melanogaster (HÄGELE, 1973) ebenfalls ein Muster des Typs "diskontinu-

---

[1] Die römischen Zahlen wurden vom Autor dieser Arbeit im Interesse einer allgemeinen Darstellung eingeführt. In der Originalarbeit wurden die Markierungsmuster anders bezeichnet.

TABELLE 11: Markierungshäufigkeit der polytänen Speicheldrüsenzellen von D.virilis nach ^{3}H-dThd-Kurzpulsmarkierung

Klasse	Häufigkeit
nicht markierte Zellen	426 (61 %)
markierte Zellen	267 (39 %)
Summe	693 (100%)

TABELLE 12: Markierungsverteilung nach ^{3}H-dThd-Kurzpulsmarkierung in den polytänen Speicheldrüsenzellen von D.virilis

Klasse	Häufigkeit
kontinuierlich	39 (14,6%)
diskontinuierlich[1]	228 (85,4%)
Summe	267 (100 %)

[1] Es wurde nicht zwischen diskontinuierlich I oder II unterschieden. Das Chromozentrum war in 14 % aller markierten Kerne nicht markiert. Da das kontinuierliche Muster per Definition die Markierung des Chromozentrums umfaßt, sind die 14 % ausschließlich dem diskontinuierlichen Muster I zuzuordnen.

Legende zu TABELLE 11:

Neun Kontrollautoradiographien (s. MATERIAL UND METHODEN) der 5 Minuten und 10 Minuten ^{3}H-dThd-Kurzpulsmarkierung mit nachfolgendem Austausch durch einen Überschuß an unmarkiertem Thymidin wurden zusammengefaßt. Die prozentuale Markierungshäufigkeit der einzelnen Objektträger schwankte zwischen 12 % und 67 %.

Legende zu TABELLE 12:

Die in TABELLE 11 dargestellten Werte wurden entsprechend ihrer Markierungsverteilung aufgeschlüsselt.

ierlich I". Dieses Muster ist vor allem durch die Markierung von Interbanden, Puffs und dünnen Querscheiben charakterisiert. Das Chromozentrum ist in dieser Phase nicht markiert.

Parallel zu den DNS-Fadenautoradiographien angefertigte Kontrollautoradiographien polytäner Speicheldrüsenkerne von D. virilis wurden auf ihre Markierungshäufigkeit und ihre Markierungsmuster hin untersucht (TABELLEN 11 und 12). Nimmt man das Markierungsverhalten des Chromozentrums als Kriterium, so lassen sich auch bei D. virilis die zwei diskontinuierlichen Muster (I und II) nachweisen, die durch den kontinuierlichen Markierungstyp verbunden sind. Bei lockerer Markierung über den Chromosomen zeigt das Chromozentrum bei "diskontinuierlich I" nur geringe Markierung (ABBn. 24a,25a). Die Markierung über den Chromosomenarmen kann sich noch verstärken, während das Chromozentrum noch immer schwache Markierung zeigt (ABB. 24b). "Diskontinuierlich I" wird abgelöst durch die kontinuierliche Markierung. Alle Riesenchromosomenarme und das Chromozentrum zeigen durchgehende Markierung (ABBn. 24c und 25b). Einer der möglichen diskontinuierlich II Markierungstypen ist in ABB. 24d wiedergegeben. Das Chromozentrum und einige Abschnitte auf den Chromosomenarmen sind markiert, während die restlichen Bereiche keine Markierung zeigen. Bezogen auf das Chromozentrum stellt die ABB. 24a, bzw. 24b das komplementäre Muster zu 24d dar.

Wie in III.2.2. und ABBn. 7 und 12 gezeigt wurde, ist das α-Heterochromatin unterrepliziert, d.h., es läßt sich keine Verdopplung der Satelliten-DNS während des 3. Larvenstadiums nachweisen. Demzufolge ist die Markierung des Chromozentrums ausschließlich auf das β-Heterochromatin zurückzuführen. Wie in ABB. 19 gezeigt, ist das β-Heterochromatin angereichert mit repetitiven Sequenzen, die von den Satelliten I, II und III der diploiden Zellkerne verschieden sein müssen, da keine Kreuzrenaturierung erfolgte. Im Vergleich mit den euchromatischen Riesenchromosomen ist das β-Heterochromatin spät-replizierend. Aus der geringen Zahl der gefundenen Muster des Typs "diskontinuierlich I" läßt sich folgern, daß diese Anfangsphase in D. virilis relativ kurz sein muß (vgl. a. HÄGELE, 1973). In TABELLE 11 ist

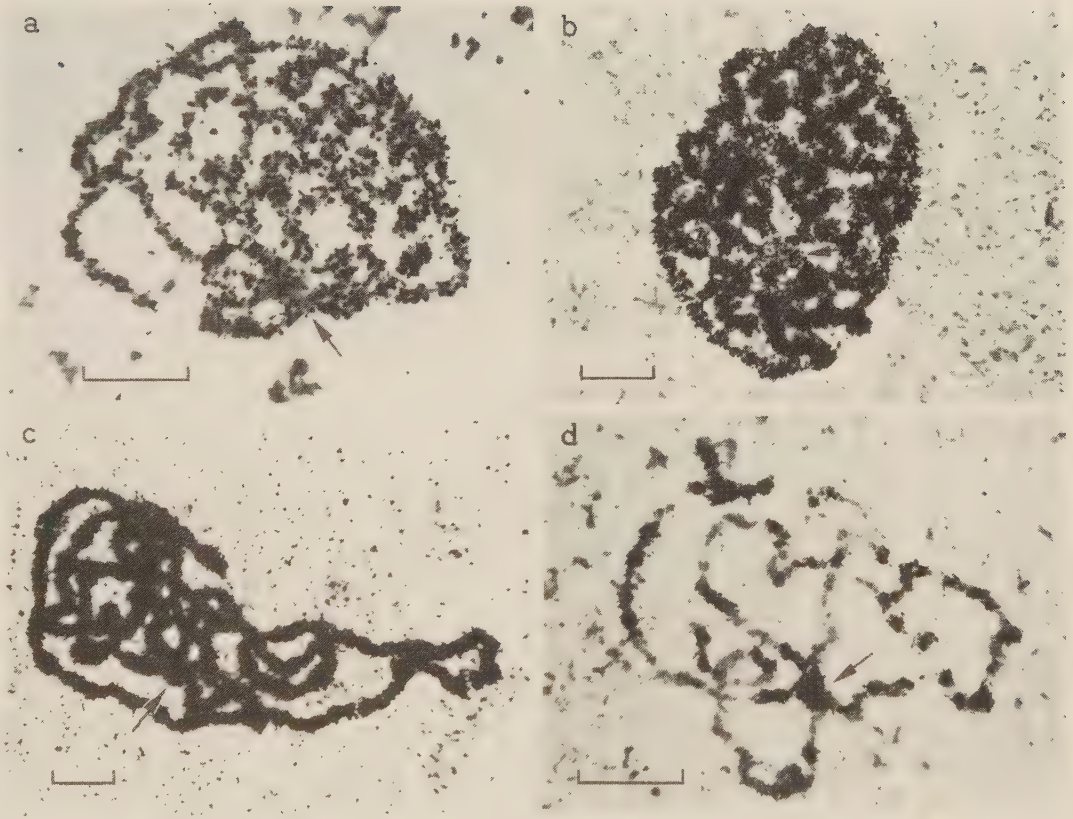


ABB 24

Legende zu ABB. 24:

Markierungsmuster polytäner D.virilis Speicheldrüsenkerne nach ^{3}H-dThd-Kurzpulsmarkierung. Die Markierungsmuster wurden den Kontrollautoradiographien (5 und 10 Min. heißer Pulslänge) entnommen. 11 Tage exponiert. Giemsa gefärbt. Maßstab 20 µm.

a) Diskontinuierlich I Markierung (s. Text). Chromozentrum (Pfeil) kaum markiert.

b) Diskontinuierlich I Markierung. Die Markierung über den Riesenchromosomenarmen ist verstärkt, während das Chromozentrum nur vereinzelt markiert ist.

c) Kontinuierliche Markierung. Sowohl Riesenchromosomenarme als auch das Chromozentrum (Pfeil) sind von einer kontinuierlichen Silberkörnchenschicht bedeckt.

d) Diskontinuierlich II Markierung (s. Text). Das Chromozentrum (Pfeil) und einige Abschnitte der Riesenchromosomen sind markiert.

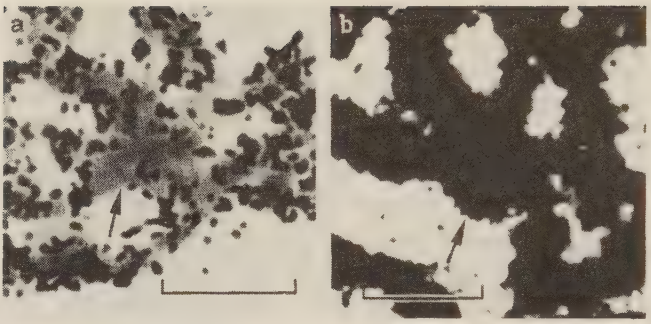


ABB.25

Legende zu ABB. 25:

Chromozentren Markierung. Die Chromozentren (Pfeile) (a) und (b) sind Ausschnittsvergrößerungen aus ABB. 24a und c. (a) diskontinuierlich I, (b) kontinuierlich. Giemsa gefärbt. Maßstab 10 µm.

die Markierungshäufigkeit nach ^{3}H-dThd-Kurzpulsmarkierung dargestellt. Der sich daraus ableitende M.I. beträgt 0,39 ± 1,9%.

5. Gliederung und Ablauf der DNS-Verdopplung in *D. virilis* Gehirnen und Speicheldrüsen

Das mitotische Interphasechromosom besteht in der G_1 Phase aus einer Chromatide. Molekular gesehen, ist die Chromatide ein langes DNS-Fadenmolekül (KAVENOFF und ZIMM, 1973), welches mit Histon- und Nichthistonproteinen komplexiert ist. Wie Untersuchungen von CAIRNS (1966), HUBERMAN und RIGGS (1968), CALLAN (1972) und anderen Autoren zeigen, wird das DNS-Makromolekül von mehr als einer Initiationsstelle (Origin) im Verlauf der S-Phase verdoppelt. Die Verdopplung erfolgt im allgemeinen bidirektional (HUBERMAN und RIGGS, 1968). Von einem gemeinsamen Origin erfolgt das Kettenwachstum in zwei divergierenden Wachstumspunkten, den Replikationsgabeln (RG). Die konvergierenden Replikationsabschnitte (RA), die jeweils eine Replikationsgabel enthalten, werden nach dem Kettenabbruch verknüpft. Zwei Möglichkeiten des Kettenabbruches werden diskutiert: Einerseits könnte der Kettenabbruch durch das Zusammentreffen der konvergierenden Wachstumspunkte erfolgen; andererseits könnten praefixierte Terminationsorte die Replikationsgabeln zum Kettenabbruch veranlassen (s. ABB. 32). Letztere Alternative hätte zur Folge, daß eine Verknüpfung der konvergierenden RAs erst dann erfolgen kann, wenn beide RAs diesen Punkt erreicht haben.

Viele Replikationsgabeln sind gleichzeitig aktiv. Es wird jedoch davon ausgegangen, daß nicht alle Replikationseinheiten synchron angeschaltet werden. Die aktiven Einheiten scheinen vielmehr in Gruppen (clusters) aufzutreten (EDENBERG und HUBERMAN, 1975). Manche Autoren nehmen an, daß die Initiation innerhalb dieser Einheiten synchron erfolgt; d.h., sie betrachten die clusters als eine den Replicons übergeordnete Replikationseinheit (HAND, 1978). Die im folgenden dargelegten Befunde führen jedoch zu einer davon abweichenden Arbeitshypothese.

Ein Großteil der Kenntnisse, die wir über die Topographie der Initiationsstellen, die Replikationsrichtung und die Replikationsrate der Wachstumspunkte besitzen, wurde mit der Methode der DNS-Fadenautoradiographie durch Ausmessen der Autoradiogramme und ihrer Zwischenräume gewonnen (HUBERMAN und RIGGS, 1968). Autoradiogramm (ARG) bezeichnet in diesem Zusammenhang eine kontinuierliche Silberkörnchenspur. Gewöhnlich sind mehrere Autoradiogramme (ARGs) tandemartig aneinandergereiht. Für derartige "tandem arrays" wird in dieser Arbeit der Ausdruck "ARG-Serien" verwendet, da die analysierten ARGs von nicht synchronisierten Zellen nicht immer das Bild von "tandems" vermitteln.

5.1. DNS-Fadenautoradiogramme von Gehirnlysaten

5.1.1. Richtung der Replikation

Unmittelbar aufeinanderfolgende Pulsmarkierungen unterschiedlicher Intensität ergeben DNS-Fadenautoradiographien, die es erlauben, die Wachstums-Richtung der Replikationsgabeln zu bestimmen. Zwei Pulsfolgen kommen in Frage: (i) Ein Anfangs-Puls hoher spezifischer Aktivität (heißer Puls), dem als zweiter ein kalter Puls folgt (s.a. HUBERMAN und RIGGS, 1968; HUBERMAN und TSAI, 1973). (ii) Ein Anfangs-Puls geringer spezifischer Aktivität (warmer Puls), an den sich ein Puls hoher spezifischer Aktivität (heißer Puls) anschließt (s.a. LARK ET AL., 1971). Wichtige Voraussetzungen für eindeutige Pulsmarkierungen sind: (i) Blockierung der zellulären dTMP-Synthese aus dUMP bei gleichzeitigem Entleeren des endogenen dTTP-Vorrats (Pool). Dies bewirkt ein unmittelbares, scharfes Einsetzen der Pulsmarkierung; (ii) die Unterschiede in der spezifischen Aktivität der aufeinanderfolgenden Pulse sollten mindestens 3:1 betragen (HUBERMAN und TSAI, 1973).

Beide Versuchsanordnungen wurden mit D. virilis Gehirnen durchgeführt (s. ABB. 3). Die DNS-Fadenautoradiographien wurden systematisch auf freiliegende ARG-Serien abgesucht. Alle verwendbaren Stellen wurden photographiert und die Positive ausgewertet. Zur

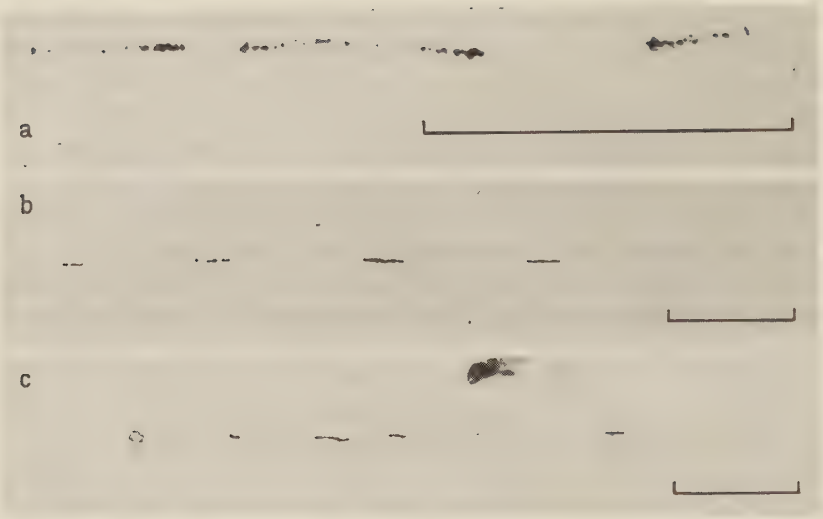


ABB.26

ABB.27

Legende zu ABB. 26:

Replikationsrichtung. Beispiele sind verschiedenen Zeitwerten von D.virilis Gehirnen entnommen, die nach Versuchsprotokoll a (ABB. 3) pulsmarkiert wurden. Eine systematische Auswertung der ARGs der 10 Minuten-Werte auf Bi- bzw. Unidirektionalität ergab: 93% bi- und 7% unidirektionale ARGs (n = 150). 7 Monate exponiert. Maßstab 50 µm.
a) Bidirektional
b) und (c) unidirektional (s. Text und Legende zu ABB. 32).

Legende zu ABB. 27:

Replikationsgabel und Tochterstränge. Beispiele sind verschiedenen Zeitwerten der D.virilis Gehirne entnommen, welche nach Versuchsprotokoll a (ABB. 3) pulsmarkiert wurden. 7 Monate exponiert. Maßstab 50 µm.
a) Tochterstränge münden am linken Ende in eine Gabelstruktur ein (Replikationsgabel).
b) Tochterstränge.

Bestimmung der Replikationsrichtung wurden nur ARGs verwendet, die die Doppelpulsmarkierung klar zeigten. Auch fanden nur interne ARGs Verwendung (s. MATERIAL UND METHODEN). Von 150 analysierten ARGs ließen sich 139 (93%) ARGs eindeutig dem bidirektionalen Replikationstyp zuordnen und 11 (7%) dem unidirektionalen (ABB. 26). Eine Erklärungsmöglichkeit für die Entstehung unidirektionaler ARGs wird in ABB. 32 angedeutet.

Einige ARG-Serien wurden gefunden, deren identisches Markierungsmuster in parallel liegenden Strängen für teilweise, bzw. vollständig getrennte Tochterstränge spricht (s. ABB. 27a,b). In der ARG-Serie in ABB. 27a münden die Tochterstränge einer Seite in einer Gabelstruktur. Aus diesem Befund läßt sich auch in D. virilis auf eine Replikation in gabelähnlichen Wachstumspunkten (Replikationsgabeln) schließen.

5.1.2. Replikationsrate der Wachstumspunkte

Die Replikationsrate wurde bestimmt durch Ausmessen von Pulsmarkierungen bekannter Pulsdauer, die von Pulsmarkierungen geringer Intensität flankiert wurden. Werden die Pulsmarkierungszeiten kurz genug gewählt, so hat man mit diesem Markierungsablauf in den nicht synchronisierten Zellpopulationen den Vorteil, fusionierte von nicht fusionierten Replikationsabschnitten unterscheiden zu können (s.a. III.5.1.3.). Als Pulszeit wurde der Zeitabschnitt zwischen Beginn des heißen Pulses und dessen Abstoppen im Eis genommen. Nach Transfer der Organe in Medium mit 10facher kalter dThd-Konzentration wurden diese erneut inkubiert.

In die Pulslängenmessung gehen zwei Zeitverzögerungen ein. Es sind dies die Zeiten, welche von den beiden aufeinanderfolgenden Pulsen jeweils benötigt werden, bis sie den Wachstumspunkten zur Verfügung stehen. In der Annahme, daß beide Zeitverzögerungen ähnlich sind, sollten sie sich gegenseitig aufheben (s.a.II.4.). Gemessene Pulslänge war die Entfernung zwischen der scharfen Anfangsstufe bis zum Übergang in die Pulsmarkierung geringer Intensität. Der Übergang ist in den meisten Fällen deutlich auszumachen (s. z.B. ABBn. 28a-e und 30a,b). Vor allem bei den

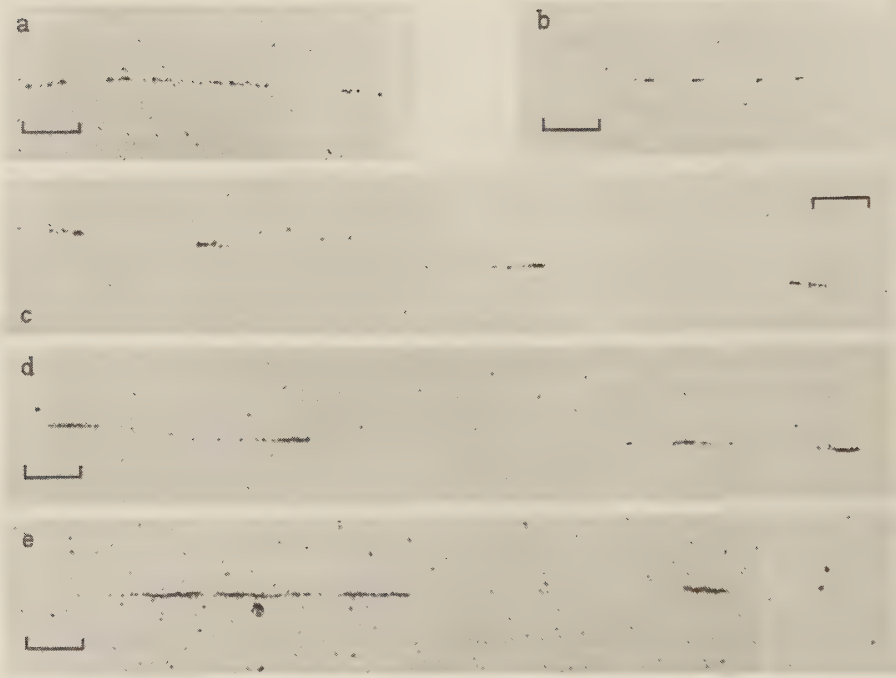


ABB.28

Legende zu ABB. 28:

Markierungsspuren verschieden langer Pulszeiten (heißer Puls) aus D.virilis Gehirnlysaten. Die Pulsmarkierung der Gehirne erfolgte nach Versuchsprotokoll a (ABB. 3), heißer Puls - kalter Puls. Die heißen Pulszeiten variierten, während der kalte Puls konstant gehalten wurde. 7 Monate exponiert. Maßstab 20 µm.

a) und (b) 5 Min. Puls

c) 10 Min. Puls

d) 30 Min. Puls

e) 60 Min. Puls

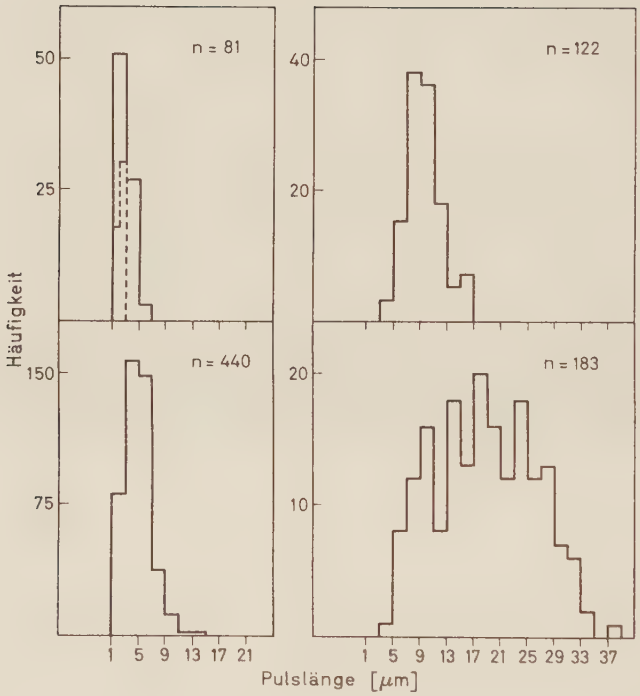


ABB.29

Legende zu ABB. 29:

Verteilung der Längen der Markierungsspuren (heißer Puls) aus D.virilis Gehirnlysaten (s. Legende ABB. 28). Gemessen wurden alle Pulsmarkierungen, deren Anfänge mit einer distinkten Markierungsstufe einsetzten (Beginn der heißen Puls-Markierung) und deren Ende flankiert war von der Pulsmarkierung (zweiter Puls) mit geringer Intensität.
Oben links: 5 Min. Puls (n= 81). Durch den gestrichelten Linienzug wird angedeutet, daß die 2 µm Klasse in zwei 1 µm Klassen gespreitet ist.
Unten links: 10 Min. Puls (n = 440)
Oben rechts: 30 Min. Puls (n = 122)
Unten rechts: 60 Min. Puls (n = 183)

TABELLE 13: Mittlere Pulslängen aus D.virilis Gehirnen

Pulsdauer in Minuten	n	s in µm	$\bar{x}$ in µm	v_{RG} in µm x Min.$^{-1}$
5	81	1,1	2,8	0,56
10	440	2,1	4,9	0,49
30	122	2,6	9,7	0,32
60	183	7,4	18,6	0,31

Mittlere Pulslängen von D.virilis Gehirnen, welche nach Versuchsprotokoll a (ABB. 3) pulsmarkiert wurden. n: Stichprobenumfang; s: Standardabweichung der Stichproben; $\bar{x}$: Stichprobenmittelwert; v_{RG}: Geschwindigkeit der Wachstumspunkte (Replikationsgabeln) der Replikationsabschnitte (RAs).

kürzeren Pulslängen erscheint der Übergang abrupt und sprungartig. Daraus läßt sich ableiten, daß sich das Gleichgewicht zwischen der exogenen Konzentration von kaltem dThd und der endogenen radioaktiv-markierten Vorstufenkonzentration in diesem System schnell einstellt. Der Fehler in der Bestimmung des Übergangs liegt im Fehlerbereich der Längenmessung.

D. virilis Gehirne wurden nach Protokoll a (ABB. 3) pulsmarkiert. Die DNS-Fadenautoradiographien der 5-, 10-, 30- und 60-Minuten-Werte wurden systematisch durchmustert und alle Pulsmarkierungen ausgemessen, die von Pulsmarkierungen geringerer Intensität flankiert waren. Die Ergebnisse sind in TABELLE 13 zusammengefaßt. Die aus den Pulslängen errechneten Replikationsraten der Wachstumspunkte reichen von 0,31 µm x Min.$^{-1}$ bis 0,56 µm x Min.$^{-1}$.

5.1.3. Länge der Replicons

Als Repliconlängen werden die Origin-Origin-Entfernungen zwischen benachbarten Initiationspunkten (Origins) definiert (HUBERMAN und RIGGS, 1968; ABB. 32). Es wird also nicht direkt die Länge der beiden vom Origin divergierenden RAs eines Replicons gemessen. Es ist technisch schwierig, Terminationsorte eines Replicons aus der Pulsfolge, "heiß"-"kalt", genau zu bestimmen, im Gegensatz zur Origin-Lokalisation. Von der O.-O.-Länge wird angenommen, daß sie der Summe zweier benachbarter, divergierender RAs entspricht und ein geeignetes Kriterium für die Charakterisierung der Repliconlänge darstellt (HUBERMAN und RIGGS, 1968); jedoch bei benachbarten Replicons unterschiedlicher Länge werden durch dieses Verfahren die Längenunterschiede angeglichen (vgl. z.B. ABB. 30h).

Zur O.-O.-Längenbestimmung in D. virilis Gehirnen wurden die DNS-Fadenautoradiographien der 10 Min.-Serie verwendet. D. virilis Gehirne wurden für 10 Min. nach Protokoll a (ABB. 3) pulsmarkiert. Die größte Zahl der Beobachtungen entfällt auf Pulsmarkierungen divergierender RAs, die durch eine unmarkierte Lücke getrennt sind (ABBn. 28 und 30a,b). Nur vereinzelt fanden sich divergierende RAs ohne Lücke (ABB. 34a,b), d.h., die Situation, in der

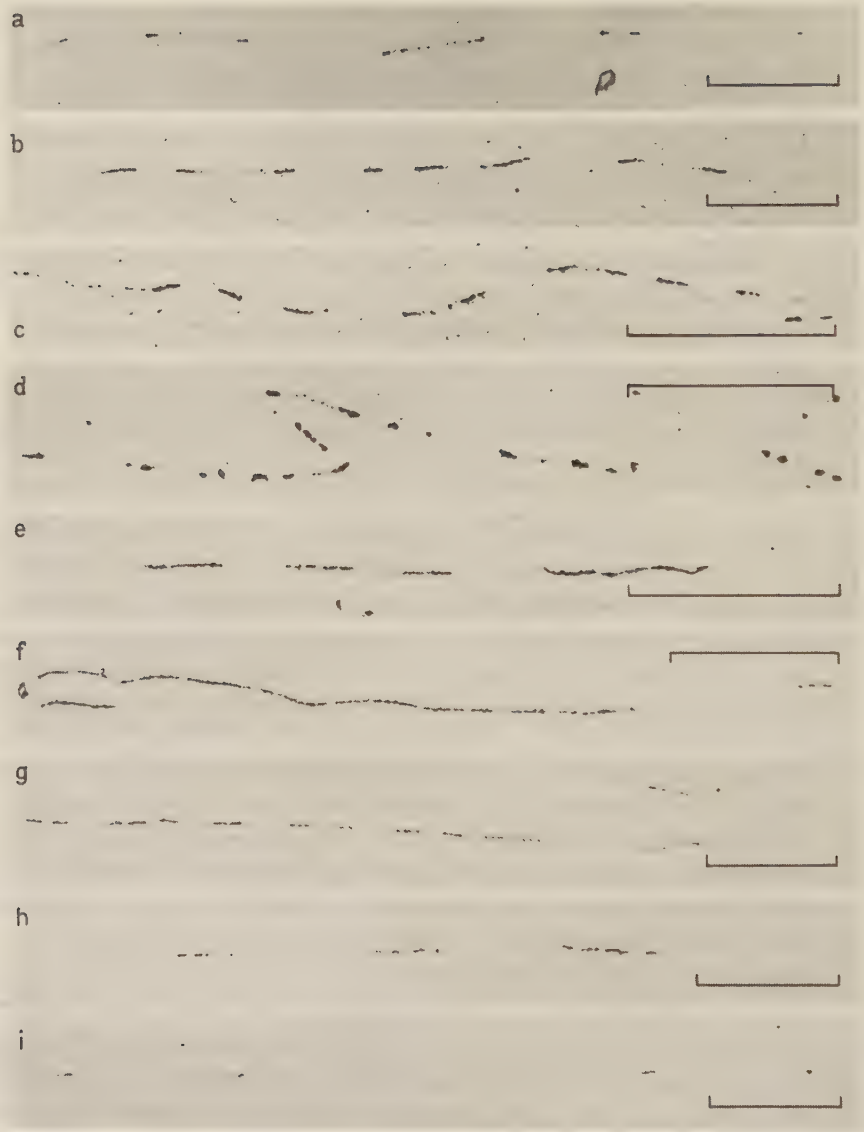


ABB.30

Legende zu ABB. 30:

ARG-Serien unterschiedlicher ARG Anordnungen. Nicht synchronisierte Zellpopulationen von D.virilis Gehirnen wurden nach Versuchsprotokoll a pulsmarkiert. Die ARG-Serien sind aus Experimenten unterschiedlich langer Pulszeiten (heißer Puls) zusammengestellt. 7 Monate exponiert. Maßstab 50 µm.

a) Jede erste Pulsmarkierung (heißer Puls) ist in der dem Origin abgewandten Seite flankiert von einer zweiten Pulsmarkierung (kalter Puls) mit geringer Intensität.

b) Wie (a), jedoch enthält das mittlere ARG nur die erste Pulsmarkierung (heißer Puls).

c) ARG-Serie mit mehreren ARGs, welche nur erste Pulsmarkierung (heißer Puls) zeigen.

d) Zwei ARGs, die Doppelpulsmarkierung (erster und zweiter Puls) zeigen, sind eingestreut in eine ARG-Serie, deren ARGs ansonsten nur erste Pulsmarkierung (heißer Puls) zeigen.

e) Lange ARGs mit nur erster Pulsmarkierung (heißer Puls). Die ARG-Längen sind $\leq$PL (ABB. 32) mit Ausnahme des ganz rechten ARGs, das >PL ist.

f) Lange ARGs mit nur erster Pulsmarkierung (heißer Puls). Das sechste ARG, links der großen $\overline{P_l P_r}$-Lücke (ABB. 32) ist >2 PL. Die links daran anschließenden ARGs sind >PL mit zwei Ausnahmen; die rechts des sechsten ARGs liegenden ARGs sind <PL. Die $\overline{P_l P_r}$-Länge auf der rechten Seite der ARG-Serie ist groß im Vergleich zu den nach links anschließenden, relativ homogenen $\overline{P_l P_r}$-Längen.

g) ARG-Serie mit relativ homogenen ARGs. Alle ARGs sind <PL. Von links bis zur großen $\overline{P_l P_r}$-Lücke sind die $\overline{P_l P_r}$-Längen relativ homogen.

h) ARG-Serie mit 3 ARG-Gruppen (clusters), welche durch zwei ähnliche, große $\overline{P_l P_r}$-Längen getrennt werden. Die ARG-Längen der clusters sind <PL; die $\overline{P_l P_r}$-Längen innerhalb der clusters relativ homogen.

i) ARGs durch lange $\overline{P_l P_r}$-Längen getrennt.

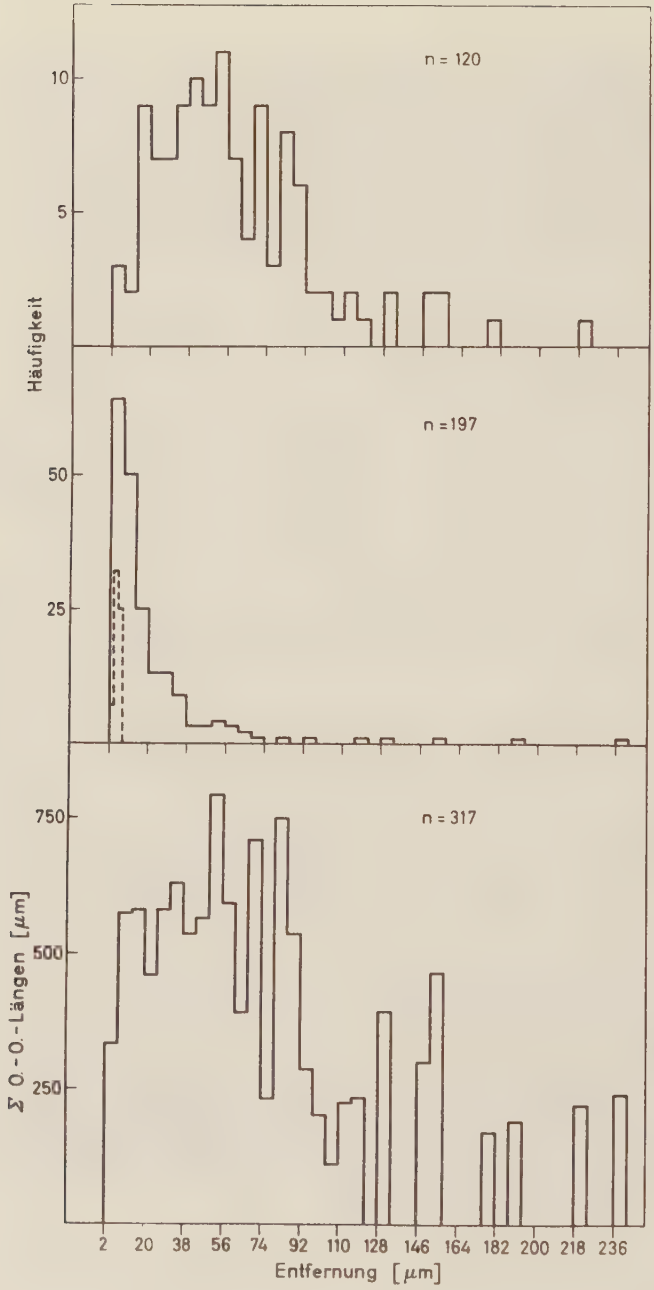

n = 120
n = 197
n = 317
Häufigkeit
Σ O.-O.-Längen [μm]
Entfernung [μm]
10
5
50
25
750
500
250
2
20
38
56
74
92
110
128
146
164
182
200
218
236

ABB.31

Legende zu ABB. 31:

Verteilung der Origin-Origin-Längen in D.virilis Gehirnlysaten. D.virilis Gehirne wurden 10 Minuten nach Protokoll a (ABB. 3) pulsmarkiert. Der Origin eines Replicons wurde jeweils in der Mitte der $\overline{P_l P_r}$-Längen angenommen. Die Entfernungen zwischen benachbarten Origins wurden bestimmt (s. MATERIAL und METHODEN und ABB. 32), und die gemessenen O.-O.-Längen wurden in Klassen der Klassenbreite 6 µm eingeteilt. Die Verteilungen oben und Mitte sind positiv schief und weisen einen exzessiv entwickelten positiven Auslauf auf.

Wie in ABB. 30 gezeigt, finden sich in den ARG-Serien einerseits ARGs, welche die Doppelpulsmarkierung (heißer Puls - kalter Puls) zeigen (ABB. 30a, b), andererseits finden sich ARGs mit nur erster Pulsmarkierung (heißer Puls), s. ABB. 30e - i.
Oben: Verteilung der O.-O.-Längen unter ausschließlicher Berücksichtigung der O.-O.-Längen mit Doppelpulsmarkierung; d.h. heiße Puls-Markierung flankiert vor Pulsmarkierung geringer Intensität (kalter Puls). Medianwert der Häufigkeitsverteilung 52,2 µm (s.a. TABELLE 14).
Mitte: Verteilung der O.-O.-Längen gemessen zwischen ARGs, die nur erste Pulsmarkierung (heißer Puls) aufweisen. Im gestrichelten Linienzug wurde die erste 6 µm Klasse in 3 Unterklassen zu 2 µm aufgegliedert. Medianwert der Häufigkeitsverteilung 12,1 µm.
Unten: Replizierte DNS-Längen (Σ O.-O.-Längen pro Entfernungsklasse); Klassenbreite 6 µm. Die Meßwerte, oben und Mitte wurden vereint. Σ O.-O.-Längen pro Klasse wurde erhalten durch Multiplikation der Klassenmitten mit den Klassenhäufigkeiten (s.a. TABELLE 15). Medianwert der Verteilung 61,7 µm.

TABELLE 14: Repliconlängen (O.-O.-Längen) aus D.virilis Gehirnen

O.-O.-Längen	R[1] in µm	$\tilde{x}$[2] in µm	Q_1[3] in µm	Q_3 in µm	n[4]
a) beide RAs jeweils mit Doppelpulsmarkierung	5-218	52,2	35,8	68,6	120
b) ARGs mit nur einer Pulsmarkierung (heißer Puls)	2-238	12,1	6,2	18,1	197
c) Längen von a) und b) vereinigt	2-238	21,0	7,0	35,0	317

[1]R, Spannweite; [2]$\tilde{x}$, Median der Stichprobe; [3]Q_1, unteres Quartil; Q_3, oberes Quartil; [4]n, Stichprobenumfang.

Charakterisierung der O.-O.-Längenverteilung. D.virilis Gehirne wurden nach Versuchsprotokoll a (ABB. 3) für 10 Minuten pulsmarkiert. In den DNS-Fadenautoradiographien wurden die Origin-Origin-Entfernungen bestimmt (s. MATERIAL UND METHODEN), wobei die Origins jeweils in der Mitte der $\overline{P_l P_r}$-Längen angenommen wurden. Die O.-O.-Längen wurden entsprechend der beiden gefundenen ARG-Typen zunächst getrennt ausgewertet, a) und b). In c) wurden die Ergebnisse von a) und b) vereinigt.

TABELLE 15: Replizierte DNS-Länge pro Repliconklasse (18µm) in D.virilis Gehirnen

Gruppierte O.-O.-Intervalle (Replicons) in µm	Absoluter Längenanteil in µm	Relativer Längenanteil in %
2 - 20	1485	13,2
20 - 38	1670	14,8
38 - 56	1892	16,8
56 - 74	1690	15,0
74 - 92	1512	13,4
92 - 110	594	5,3
110 - 128	464	4,1
128 - 146	393	3,5
146 - 164	763	6,8
164 - 182	179	1,6
182 - 200	191	1,7
200 - 218	0	0
218 - 236	221	2,0
236 - 254	239	2,1
Summe	11 293	100,3

Die O.-O.-Längen der Verteilungen in ABB. 31, Oben und Mitte, wurden vereint und die Werte in Klassen der Klassenbreite 18µm eingeteilt. Der absolute Längenanteil (Σ O.-O.-Längen) wurde durch Multiplikation der Klassenmitten mit den Klassenhäufigkeiten erhalten. Die relativen Längenanteile errechneten sich aus den Quotienten der absoluten Längenanteile der einzelnen Klassen und der Gesamtlänge in Prozent. 100,3 % entstanden durch Rundungen.

im Verlauf der Pulsgabe initiiert wurde, war selten. Der Abstand zwischen den beiden Pulsmarkierungen der divergierenden RAs eines Replicons soll als "$\overline{P_1P_r}$" bezeichnet werden (ABB. 32 und III.5.1.5.), wobei der Origin jeweils im Mittelpunkt der $\overline{P_1P_r}$-Längen angenommen wurde.

Wie die in ABB. 30 zusammengestellten ARG-Serien zeigen, traten zwei ARG-Formen auf, solche, die aus zwei konvergierenden RAs bestehen, was an der Markierungsfolge "heiß-kalt" erkennbar ist. Dieser ARG-Typ wurde nach dem Versuchsablauf erwartet. Andererseits fanden sich ARGs, die nur die heiße Pulsmarkierung zeigten. Diese ARGs umfaßten Längen $\leq$ PL, $\leq$ 2PL und > 2PL (s. Legende ABB. 32 und z.B. Legende ABB. 30). Die gemessenen O.-O.-Längen wurden entsprechend den beiden ARG-Typen zunächst getrennt ausgewertet. Die Ergebnisse sind in TABELLE 14a, b und ABB. 31 oben und Mitte dargestellt. Beide Verteilungen sind positiv schief und weisen einen positiven Auslauf auf. ARGs ohne zweite Pulsmarkierung treten gehäuft bei kurzen O.-O.-Längen auf ($\tilde{x}$ = 12,1 µm). Dagegen zeigen ARGs, die beide Pulsmarkierungen enthalten, eine Häufigkeitsverteilung um den 4,3fach höheren Medianwert von 52,2 µm. Die unterschiedlichen Verteilungen werden in den Histogrammen der ABB. 31 deutlich. Da ARGs ohne zweite Pulsmarkierung bevorzugt in kurzen Replicons auftreten, liegt der Schluß nahe, daß es sich um fusionierte, konvergierende RAs benachbarter Replicons handelt. Werden die Ergebnisse beider Verteilungen vereinigt (TABELLE 14c), so liegt der Medianwert der gesamten O.-O.-Häufigkeitsverteilung bei 21,0 µm.

Die Frage, welchen Anteil am Gesamtbild der DNS-Verdopplung die einzelnen Repliconklassen einnehmen, wurde in ABB. 31 unten und in TABELLE 15 nachgegangen. Aus Vergleichsgründen wurde in ABB. 31 unten dieselbe Klassenbreite verwendet wie oben und in der Mitte. Wählt man als Klassenbreite 6 µm, so liegt das Dichtemittel (D) der Verteilung in der Klasse 50 - 56 µm. In TABELLE 15 wurde eine 3fach größere Klassenbreite, 18 µm gewählt. Der Medianwert, errechnet aus diesen Werten, liegt bei 61,7 µm, also einiges höher als der Medianwert der reinen Häufigkeiten ($\tilde{x}$ = 21,0 µm); d.h., 50% der ausgemessenen DNS-Längen werden von Replicons $\leq$61,7 µm verdoppelt. 75% der ausgemessenen DNS wird von Replicons $\leq$ 88,6 µm (Q_3 in TABELLE 22) repliziert.

Sieht man einmal von dem Problem der asynchronen Initiation der Origins ab, so definieren die längsten Replicons die absolute Zeitdauer der Chromosomenverdopplung. Die größte O.-O.-Länge, welche in dieser Serie ausgemessen wurde, beträgt 238 µm. Diese O.-O.-Länge ist in der ARG-Serie in ABB. 33a enthalten: 238 µm, 193 µm, 148 µm und 218 µm (von links). In ABB. 33b lassen sich zwei O.-O.-Längen ausmessen: 259 µm und 372 µm (von links). Das begrenzende rechte ARG ist jedoch nicht eindeutig als solches auszumachen (s.a. Fehlermöglichkeiten unten). 372 µm war die größte ausgemessene O.-O.-Länge in den Gehirnen überhaupt. Alle Messungen basieren auf der Annahme, daß der Origin in der Mitte der $\overline{P_1P_r}$-Längen liegt. Nimmt man 372 µm als obere Begrenzung der Repliconlängen, so entspricht dies, bei der oben angenommenen Replikationsrate von 0,35 µm x Min.$^{-1}$ einer maximalen Verdopplungszeit von 8,9 Stdn.. Setzt man die obere Grenze der Repliconlängen bei 250 µm an, so würde dies einer Verdopplungszeit von 6 Stdn. entsprechen.

Als Fehlerquellen bei den O.-O.-Längenmessungen kommen in Frage: (i) In dicht zusammenliegenden Replicons ist die Wahrscheinlichkeit groß, daß konvergierende RAs während des ersten Pulses fusionieren und ein ARC bilden (s. z.B. ABB. 30g). Auch konvergierende RAs größerer Replicons, die sich an den Replicongrenzen befinden (nicht synchronisierte Zellpopulationen), können fusionieren (s. ABB. 33a). Diese Fehlerquelle ist hier ausgeschlossen, weil alle ARCs ohne Doppelpulsmarkierung, also die nur heiße Pulsmarkierung zeigen, als zwei verknüpfte RAs gewertet wurden. Der Origin wurde jeweils in der $\overline{P_1P_r}$-Lücke angenommen. Bei asymmetrischen Replicons können sich Fehler ergeben, wenn vor dem Einsetzen der Pulsmarkierung ein RA an einem Terminus aufgelaufen ist, bzw. wenn zwei konvergierende RAs vor der Pulsgabe fusioniert sind. Auch wenn symmetrische Replicons vor der Pulsgabe ihre Replikation beenden, kann dies zu fehlerhaften Abschätzungen der O.-O.-Längen führen. Ferner besteht die Möglichkeit, daß große $\overline{P_1P_r}$-Längen (ABB. 32) Origins enthalten könnten, die innerhalb der Markierungszeiten nicht initiierten. Alle diese Fehlermöglichkeiten lassen sich experimentell nicht ausschließen und führen zu einer Überschätzung der O.-O.-Längen. (iii) Je länger die Initiationsintervalle (O.-O.-Längen) sind, umso größer ist die Wahrscheinlichkeit, daß benachbarte ARGs

nicht eindeutig in Zusammenhang gebracht werden können (s.a. ABB. 33a,b). (iv) Je länger die Initiationsintervalle sind, umso größer ist auch die Wahrscheinlichkeit, daß ARG-Serien durch Scherung unterbrochen werden. (iii) und (iv) führen zu einer Unterschätzung der O.-O.-Längen. Die Fehlermöglichkeiten einerseits aus (ii) und andererseits aus (iii) und (iv) wirken sich entgegengesetzt auf die O.-O.-Längenabschätzung aus und kompensieren sich möglicherweise.

5.1.4. Topographie der Replicons

Wie in 5.1.3. ausgeführt, reicht die Spannweite der Replicongrößen dieser Auswertungsserie von 2 µm bis 238 µm (ABB. 31). Wie der Medianwert von $\tilde{x} = 21{,}0$ um zeigt, sind kleinere Replicons häufiger als größere. Die größeren haben jedoch den stärkeren Anteil an der absoluten Länge der verdoppelten DNS.

Drei lineare Anordnungsmuster der Repliconlängen sind denkbar: (i) Große und kleine Replicons könnten in getrennten, in sich relativ homogenen Gruppen, vorliegen. (ii) Die zahlreichen kleinen Replicons könnten mittlere bis kleine Gruppen (clusters) bilden, die durch einzelne große Replicons verbunden werden. (iii) Die Längen der einzelnen Replicons entlang des DNS-Fadenmoleküls könnten zufällig verteilt sein. Beispiele finden sich für alle drei Möglichkeiten. So entsprechen die ARG-Serien in ABB. 30a - relativ homogene große -, bzw. ABB. 30g - relativ homogene kleine - der Möglichkeit (i). (ii) wird durch ABB. 30h illustriert; c und d in ABB. 30 sind mit der Hypothese (iii) verträglich. ARG-Serien wie in ABB. 30hwaren selten. Die Frage war deshalb, welche der Alternativen, (i) oder (iii), vorliegen. Zur statistischen Überprüfung dieser Fragestellung wurde die folgende Nullhypothese[1] formuliert: - H_o: Die Repliconlängen

---

[1] In der statistischen Terminologie wurde SACHS (1978) gefolgt.

haben in allen ARG-Serien dieselbe Wahrscheinlichkeitsverteilung. -H_1: Die Repliconlängen haben in allen ARG-Serien nicht dieselbe Wahrscheinlichkeitsverteilung. Als statistisches Verfahren wurde die Varianzanalyse angewendet. Es wurde überprüft, ob die Repliconlängen innerhalb der ARG-Serie (Gruppe) dieselbe Varianz um ihren Mittelwert (Gruppenmittelwert) haben wie diese Mittelwerte um das Gesamtmittel aller gemessenen Repliconlängen.

Alle mehr als einen O.-O.-Längenwert umfassenden ARG-Serien der D. virilis Gehirne, die 10 Min. nach Versuchsprotokoll a puls-markiert waren, wurden der Urliste entnommen. Insgesamt ergaben sich 59 ARG-Serien. Für die Varianzanalyse soll jede Stichprobengruppe (ARG-Serie) einer normalverteilten Grundgesamtheit entstammen. Um dieser Bedingung annähernd gerecht zu werden, wurde für jede ARG-Serie ein Histogramm der O.-O.-Längen mit der Klassenbreite 20 µm angefertigt. Außerdem wurde eine Bandbreite von 2 Klassenbreiten, 40 µm, festgelegt und definiert: Eine ARG-Serie wird für die Varianzanalyse verwendet, wenn alle O.-O.-Längen dieser ARG-Serie innerhalb der 40 µm Bandbreite liegen. Von den 59 ARG-Serien, welche durchschnittlich 139 µm lang waren, erfüllten 43 (73%) das gesetzte Kriterium. Die durchschnittliche Länge der ausgewählten ARG-Serien betrug 95 µm. Die Histogramme der restlichen 27% zeigten Lücken (vermutlich clusters), oder ihre Verteilung war breiter als die vorgegebene Bandbreite. Mit den 73% wurde die Varianzanalyse durchgeführt. Da $\hat{F} = 6{,}04 > F_{(42,\ 146;\ 0{,}05)}$ ist, muß die Nullhypothese auf dem 5% Niveau abgelehnt werden. Für die 73% der getesteten ARG-Serien folgt, daß die Replicons innerhalb der ARG-Serien (durchschnittliche ARG-Serienlänge 95 µm) ähnlichere O.-O.-Längen enthalten, also relativ homogener sind als die Gesamtheit aller Replicons (vgl. McFARLANE und CALLAN, 1973; HAND, 1975). Die Analyse unterstützt unter den oben gemachten Annahmen die Hypothese (i).

In ABB. 32 sind idealisierte ARG-Serien dargestellt. I entspricht der Hypothese (iii), und II der alternativen Hypothese (i). Anhand der Darstellung sukzessiv veränderter Phasen der Doppelpulsmarkierung ("heiß-kalt") in b wurde versucht, das Zustandekommen der verschiedenen Typen von ARG-Serien zu veranschaulichen. a gibt jeweils die Interpretation der fiktiven ARG-Serien wieder. In A und B wurden zwei unterschiedliche Terminationsvarianten

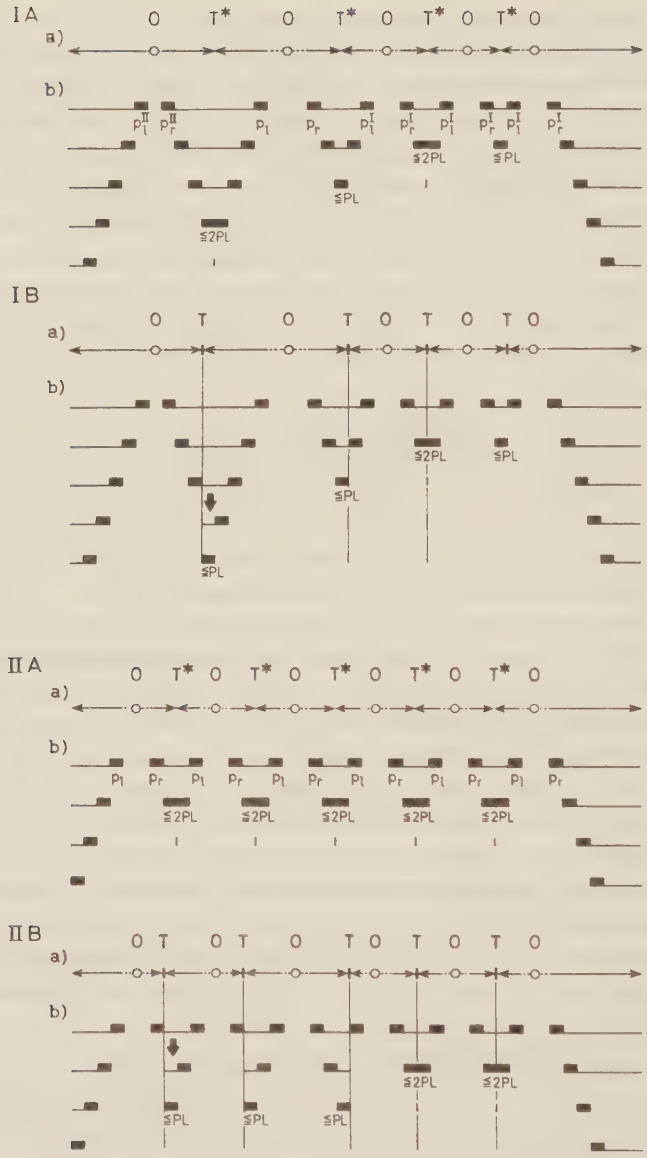


ABB.32

Legende zu A88. 32:

Schematische Darstellung bidirektional replizierender ARG-Serien in sukzessiven Replikationszuständen.

Origin (O)[1]: Gemeinsame Initiationsstelle von im allgemeinen zwei sich gegenüberliegenden, divergierenden Replikationsabschnitten (RAs). Die RAs enthalten jeweils einen Wachstumspunkt, die Replikationsgabel (RG).

Terminus (T bzw. T^*): Terminationspunkt der RGs konvergierender benachbarter RAs.

Es wurden zwei idealisierte ARG-Serien ausgewählt: I. die ARG-Serie enthält unterschiedlich lange Replicons; II. alle Replicons einer ARG-Serie sind von einheitlicher Länge.

A) liegt als Terminationshypothese zugrunde, daß die konvergierenden RGs benachbarter RAs aufeinander stoßen, Terminus (T^*).

B) liegt als Terminationshypothese zugrunde, daß der Abbruch der Replikation an praefixierten Positionen, Termini (T) erfolgt; d.h. bei asymmetrischer Anordnung von T zwischen benachbarten Origins besitzen die konvergierenden benachbarten RGs unterschiedliche Länge.

a) Interpretation der ARG-Serien.

b) Sukzessive Momentaufnahmen (entspricht den gefundenen ARG-Serien in nicht synchronisierten Zellpopulationen) replizierender Replicons.

Die Bezeichnungen P_l und P_r wurden eingeführt zur Kennzeichnung der Einsatzpunkte der Pulsmarkierung: P_l links bzw. P_r rechts vom Replikationsorigin. Bei angenommener konstanter Geschwindigkeit (v_{RG} in $\mu m \times \text{Min.}^{-1}$) der RGs der jeweiligen RAs, sind die Längen $\overline{P_l P_r}/2$, $P_l^I P_r^I/2$, $P_l^{II} P_r^{II}/2$ etc. proportional den jeweiligen verstrichenen Zeiten vom Zeitpunkt der Initiation

[1] Wenn nicht gesondert vermerkt, wurde der Terminologie in EDENBERG und HUBERMAN (1975) gefolgt.

der Replikation bis zum Einsetzen des Pulses; d.h. gleiche $\overline{P_l P_r}/2$, $\overline{P_l^I P_r^I}/2$ etc. Längen bedeuten gleiche verstrichene Zeitabschnitte. Unterscheiden sich die Längen $\overline{P_l P_r}/2$, $\overline{P_l^I P_r^I}/2$ etc., so ist dieser Längenunterschied ein Maß für die Zeitabfolge in der Initiation der DNS-Replikation.

PL bedeutet Pulslänge. Als Längenwert wurde jeweils der Mittelwert der Pulsmarkierung genommen, welcher der ARG-Serie zugrunde lag (5 Minuten, 10 Minuten Puls etc.; s.a. ABB. 3 und MATERIAL und METHODEN, II.4.); 2 PL bedeutet doppelte mittlere Pulslänge. Für >PL sollte das nur eine Pulsmarkierung (heißer Puls) zeigende ARG aus der Fusion zweier, bzw. mehrerer PLs hervorgegangen sein.

Unter der Annahme der B Hypothese mit Terminus (T) treten ARG-Serien auf, die unidirektionale Replikation vortäuschen (dicker, senkrechter Pfeil). Die Existenz praefixierter Terminationsstellen (T) wäre eine Erklärung des Phänomens der unidirektionalen ARGs (s. ABB. 28b und c; III.5.1.6.; vgl.a. HUBERMAN und TSAI, 1973).

——markierte Strecken;-----nicht markierte Strecken.

durchgespielt (s. III.5.1.6.). Es fanden sich nun Beispiele von ARG-Serien (ABB. 34), deren ARGs sich zunächst nicht aus ABB. 32 ableiten ließen, so eine Serie von ARGs aus jeweils 2 konvergierenden RAs, wobei die heiße Pulsmarkierung des einen RA's > PL und die heiße Pulsmarkierung des anderen RA's ungefähr gleich PL war (ABB. 34d); wird der Origin wie üblich in der Mitte der $\overline{P_lP_r}$-Lücke angenommen, so wären die beiden divergierenden RAs Pulsmarkierungen (heißer Puls) von unterschiedlicher Länge (Pfeile). Zwei Interpretationen bieten sich an: (i) In diesen Replicons ist die Wachstumsgeschwindigkeit in den konvergierenden RAs unterschiedlich. (ii) Die jeweils linken Pulsmarkierungen (heißer Puls) enthalten einen versteckten Origin. Dieser hat im Verlauf der Pulsmarkierung initiiert, und sein linker RA ist jeweils mit dem benachbarten, konvergierenden RA fusioniert, dessen Origin in der $\overline{P_lP_r}$-Lücke liegt. Schließt man (i) als die unwahrscheinlichere Alternative aus und akzeptiert (ii), so fordert dies asymmetrische Replicons; d.h., im Fall ABB. 34d wären die linken RAs der maskierten Origins kleiner als die rechten (s.a. ABB. 34c,e,f). Es fanden sich noch weitere ARG-Serien mit vermutlich stark asymmetrischen Replicons (ABB. 34g,h). Die ARG-Serie in ABB. 34g enthält zwei Tandems[1], die aus verschiedenen ARG-Typen bestehen. Die nach innen weisenden ARGs zeigen nur heiße Pulsmarkierung; die äußeren ARGs sind flankiert von Pulsmarkierungen geringer Intensität. Dieser ARG-Serie können folgende Alternativen zugrunde liegen: (i) Beide RAs, die von den Origins der kleinen $\overline{P_lP_r}$-Lücken nach innen divergieren, sind mit den jeweils benachbarten, konvergierenden RAs, von dem Origin der großen $\overline{P_lP_r}$-Lücke kommend, fusioniert. (ii) Es liegen praefixierte Termini (T, s. Legende ABB. 32 und III.5.1.6.) vor, die den Kettenabbruch der nach innen divergierenden RAs verursachten. Beide Versionen setzen stark asymmetrische Replicons voraus.

Praefixierte Terminationsorte (T) müssen auch angenommen werden, um die ARG-Anordnung in ABB. 34h zu interpretieren. In diesem Fall erfordern beide möglichen Interpretationen diese Annahme. Einerseits könnte der praefixierte Terminationsort am Ende des

---

[1] In ABB. 34g,h vermittelt die Anordnung der ARGs den Eindruck von Tandem-Formen.

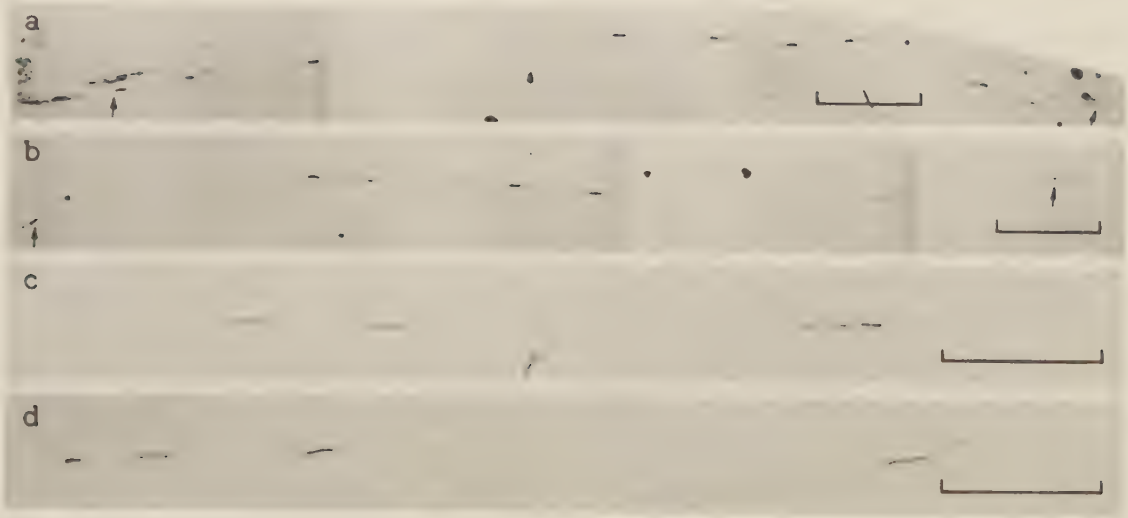


ABB.33

Legende zu ABB. 33:

Lange ARG-Serien aus D.virilis Gehirnlysaten.

Gehirne wurden nach Versuchsprotokoll a (ABB. 3) puls-markiert. 7 Monate exponiert. Maßstab 100 µm.
a) Die ARG-Serie wird rechts von einem rückgefalteten ARG (Pfeil) begrenzt und links von einem ARG (Pfeil), das nur erste Pulsmarkierung (heißer Puls) zeigt. Die ARG-Serie enthält 7 ARGs und hat eine Gesamtlänge von 964 µm.
b) ARG-Serie wird begrenzt (Pfeile) von ARGs, welche nur erste Pulsmarkierung (heißer Puls) zeigen. Die ARG-Serie enthält 4 ARGs und ist 990 µm lang. Die beiden mittleren ARGs sind mit den in ABB. 28d abgebildeten ARGs identisch.
c) ARG-Serie aus ARGs mit nur erster Pulsmarkierung (heißer Puls). Der ARG-cluster der rechten Seite ist durch eine $\overline{P_l P_r}$-Länge von 244 µm vom linken ARG getrennt. Gesamtlänge 403 µm.
d) ARG-Serie aus ARGs mit nur erster Pulsmarkierung (heißer Puls). Die $\overline{P_l P_r}$-Länge zwischen dem dritten ARG von links und dem vierten beträgt 336 µm. Gesamtlänge 565 µm.

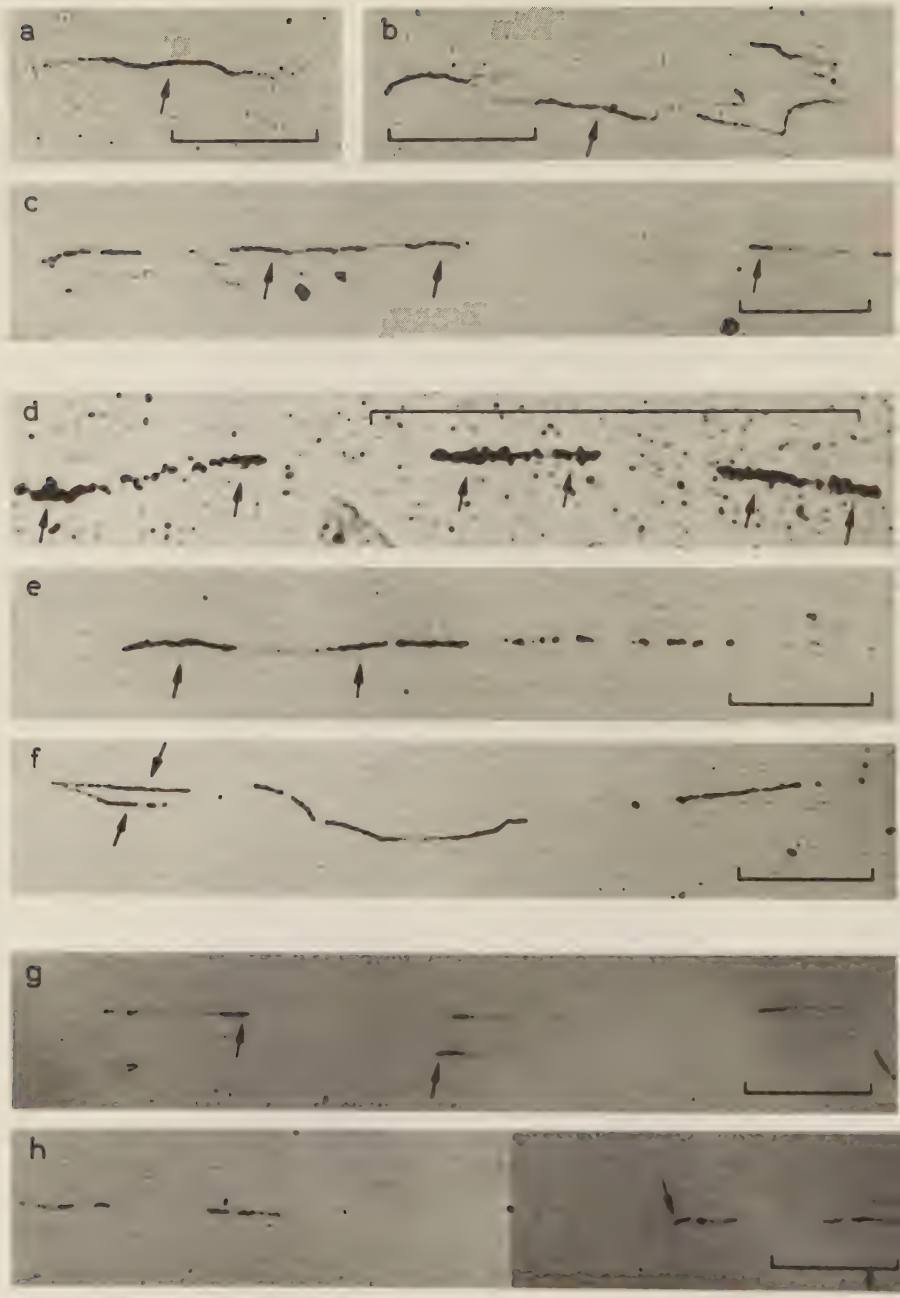


ABB.34

Legende zu ABB. 34:

ARG-Sonderformen aus *D.virilis* Gehirnlysaten. Die Gehirne wurden nach Versuchsprotokoll a (ABB. 3) pulsmarkiert. 7 Monate exponiert. Maßstab 50 μm.

a) und (b) zeigen ARGs, die eine lange Pulsmarkierung des ersten Pulses (heißer Puls) enthalten, welche an beiden Seiten durch die Pulsmarkierung des zweiten Pulses (kalter Puls) mit geringer Intensität flankiert sind. Beides sind Beispiele für Replicons, deren Origins im Verlauf der Pulsgabe aktiviert wurden; diese Situation wurde selten gefunden.

c) Die zentrale Pulsmarkierung entspricht der Situation in (a) und (b). Beide Außenpulsmarkierungen (Pfeile) dieses ARGs haben dieselbe Länge wie die mittlere. Sie sind jedoch nur auf der der Mitte zugewandten Seite von Pulsmarkierung des zweiten Pulses (kalter Puls) mit geringer Intensität flankiert. Während diese Pulsmarkierungen jeweils 2 PL entsprechen (gleich dem mittleren), entspricht der rechte Puls (Pfeil) nach der $\overline{P_l P_r}$-Lücke der erwarteten PL Länge (ABB. 32).

d) ARG-Serie mit drei ARGs, welche jeweils ungleich lange erste Pulsmarkierungen (heißer Puls) enthalten. Die rechten ersten Pulsmarkierungen (Pfeile) entsprechen in etwa PL, alle linken ersten Pulsmarkierungen (Pfeile) sind dagegen >PL.

e) Die rechte erste Pulsmarkierung (Pfeil) des linken ARGs ist gleich PL, während die linke $\geqslant$2 PL entspricht. Das folgende ARG mit nur erster Pulsmarkierung (heißer Puls) ist >PL. Die rechts daran anschließenden kleinen ARGs sind $\leqslant$PL.

f) Die obere erste Pulsmarkierung (Pfeil) des linken zurückgefalteten ARGs ist >PL, während die untere (Pfeil) ungefähr PL entspricht. Die sich nach rechts anschließenden ARGs mit nur erster Pulsmarkierung (heißer Puls) sind <PL; die beiden folgenden Pulsmarkierungen mit erster und zweiter Pulsmarkierung sind in ihren heißen Pulsmarkierungen >PL.

g) Die nach außen laufenden Pulsmarkierungen (heißer Puls) sind flankiert mit Pulsmarkierungen (kalter Puls) geringer Intensität, während die innen liegenden ARGs nur erste Puls-

markierung (heißer Puls) aufweisen (Pfeile). Die Pulsmarkierungen sind durch kleine $\overline{P_l P_r}$-Lücken getrennt, in denen die Origins anzunehmen sind.

h) ARG-Serie mit 4 ARG-Tandems. Jedes Tandem enthält ein ARG, das nur erste Pulsmarkierung (heißer Puls) und ein ARG, das die Doppelpulsmarkierung zeigt. Die ARGs mit nur erster Pulsmarkierung sind $\leqslant$ PL. Die Pulslängen der Doppelpulsmarkierung zeigenden ARGs sind etwas kleiner als die durchschnittliche Pulslänge des entsprechenden Zeitwerts.

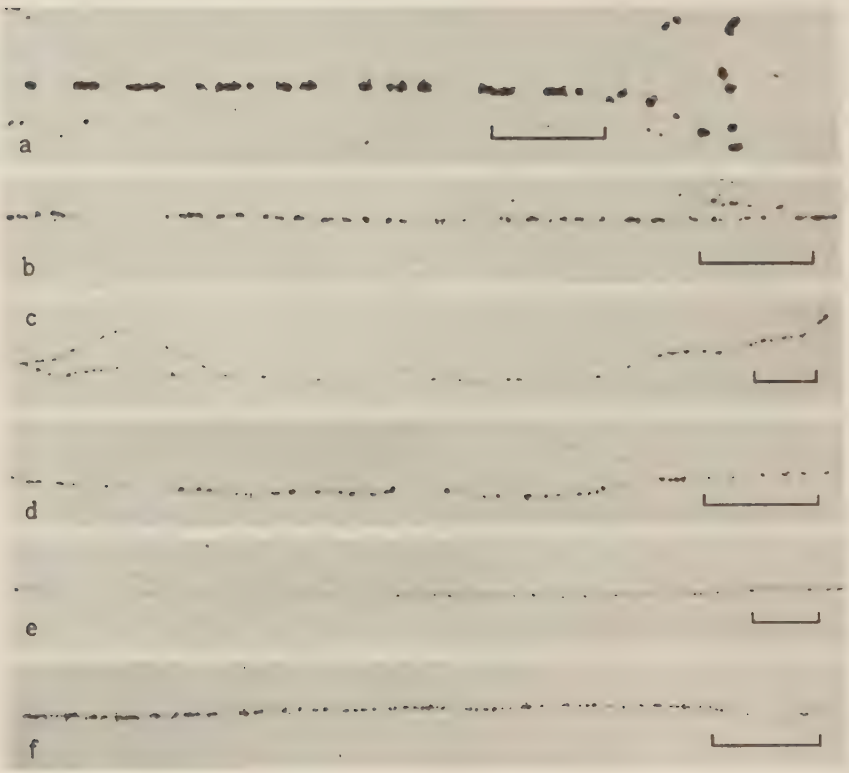


ABB.35

Legende zu ABB. 35:

ARG-Serien, korrelierbar mit der Heterochromatinverdopplung, aus D.virilis Gehirnlysaten. Gehirne wurden nach Versuchsprotokoll a (ABB. 3) pulsmarkiert. Die ARG-Serien wurden verschiedenen Pulszeiten entnommen. Gemeinsame Merkmale dieser ARG-Serien sind: i) Sie besitzen entweder nur erste Pulsmarkierung (heißer Puls); die ARGs sind kurz (a, b); ii) die Markierungsmuster entlang der DNS-Fäden sind äußerst unregelmäßig oder diffus (c - f). Die O.-O.-Längen in i) sind klein, häufig unter 10 µm. DNS-Fäden des ii) Typs (c - f) konnten quantitativ nicht erfaßt werden. 7 Monate exponiert. Maßstab 25 µm.

zweiten ARCs des zweiten ARC-Tandems von rechts angenommen werden (Pfeil). Sollte diese Annahme zutreffen, so entspricht die Situation in ABB. 33h der von HAND (1975) in Fig. 4 skizzierten Anordnung, welche er als Indikation für Termini vorschlägt (bei Versuchsbedingungen wie in ABB. 3a). Andererseits könnte dieses ARC aus einer Fusion des aus der großen $\overline{P_1P_r}$-Lücke (links) konvergierenden RAs entstanden sein; dann muß für das ARC des dritten Tandems von rechts die Situation gegeben sein, wie sie in ABB. 32 (dicker Pfeil) zur Erklärung unidirektionaler ARCs abgeleitet wurde; d.h., der von dem Origin der großen $\overline{P_1P_r}$-Lücke, zwischen zweitem und drittem Tandem, nach links divergierende RA ist an einem Terminus (T) zum Kettenabbruch veranlaßt worden, bevor die Pulsmarkierung eingesetzt hat. Unabhängig von der Terminationsart müssen asymmetrische Replicons diesem ARC-Muster zugrunde liegen.

ARCs, deren Origin während der Pulsgabe aktiviert wurden, waren selten. In ABB. 34a und b sind Beispiele dieses Markierungsmusters dargestellt; a enthält keine und b eine sehr kleine $\overline{P_1P_r}$-Länge.

Viele DNS-Fäden der D. virilis Gehirne mit Pulsmarkierung nach Versuchsprotokoll a (s. ABB. 3) zeigen Markierungsmuster wie in ABB. 35a-f dargestellt. Entweder enthielten die DNS-Fäden kurze, durch schmale $\overline{P_1P_r}$-Lücken getrennte ARCs (ABB. 35a,b), oder die DNS-Fäden zeigten unregelmäßige, bzw. diffuse Markierung (ABB. 35c-f). Das Markierungsmuster in ABB. 35a,b ist charakterisiert durch kurze ARCs mit nur einer Pulsmarkierung (heißer Puls). Ferner sind die O.-O.-Längen klein, häufig < 10 µm. Wenige ARC-Serien enthalten einige etwas größere ARCs eingestreut in die Wiederholungen der kurzen (z.B. ABB. 30d). Dieser Markierungstyp beeinflußte stark die quantitative Verteilung der O.-O.-Längen in ABB. 31 Mitte. Bei einer durchschnittlichen Länge der ARC-Serien von 130 µm steuern die ARC-Serien mit den relativ homogen verteilten kurzen ARCs überproportionale Häufigkeiten an O.-O.-Längen bei. Ein großer Teil der drei Klassen < 18 µm wird von ARCs aus ARC-Serien dieses Typs gebildet. Korrigiert man die Verteilung der vereinigten Befunde (nicht dargestellt) der ABB. 31 oben und ABB. 31 Mitte um diese kurzen "en bloc"-vor-

kommenden ARC-Serien, so ergibt sich ein erhöhter Medianwert von $\tilde{x}$ = 31,0 µm. DNS-Fäden, die eine unregelmäßige, bzw. diffuse Markierung aufwiesen (s. z.B. ABB. 35e,f) ließen sich quantitativ nicht erfassen.

5.1.5. Initiationsabfolge der Repliconorigins

Die zeitliche Initiationsabfolge aller aktivierbarer Origins entlang des chromosomalen DNS-Fadenmoleküls ist der dritte wesentliche Faktor der Chromosomenverdopplung. Zur quantitativen Beschreibung des Initiationsverhaltens wurden die unmarkierten Strecken, $\overline{P_1P_r}$-Längen, zwischen den Pulsanfängen verwendet. Mit P_1 wird das Einsetzen der "linken" und mit P_r das der "rechten" Pulsspur definiert; die unmarkierte Distanz zwischen diesen beiden Punkten beschreibt die $\overline{P_1P_r}$-Länge. Der Replikations-Origin sollte bei bidirektionaler Replikation in der Mitte von $\overline{P_1P_r}$ liegen. Es wurde jeweils nur ein Origin pro $\overline{P_1P_r}$-Länge angenommen (s.a. ABB. 32).

Ähnlich wie in III.5.1.4. ausgeführt, läßt der Vorgang der Initiation drei Interpretationen zu: (i) alle Replicons initiieren synchron (alle $\overline{P_1P_r}$-Längen sind identisch); (ii) alle Replicons initiieren asynchron (alle $\overline{P_1P_r}$-Längen sind zufällig verteilt; s.a. ABB. 32 Ib); (iii) Replicongruppen in der Größe der ARG-Serien (durchschnittliche Länge 130 µm) initiieren relativ synchron im Vergleich zur gesamten Repliconpopulation (alle $\overline{P_1P_r}$-Längen einer ARG-Serie sind homogen; s. ABB. 32 IIb). Da der Augenschein eindeutig (i) ausschließt (s. z.B. ABB. 36 und ABB. 30), wurde versucht, die Hypothese (ii) gegen (iii) nach dem in 5.1.4. beschriebenen Verfahren zu testen.

Die $\overline{P_1P_r}$-Längen der Gehirne, die nach Versuchsprotokoll a (ABB. 3) für 10 Min. pulsmarkiert waren, wurden in 10 µm Klassen eingeteilt und die Häufigkeiten der $\overline{P_1P_r}$-Längen jeweils pro ARG-Serie aufgetragen (s.a. III.5.1.4.). Es wurden nur diejenigen ARG-Serien berücksichtigt, die mehr als eine $\overline{P_1P_r}$-Länge aufwiesen. Als "homogene" ARG-Serien wurde festgelegt: Alle ARG-Serien sind hinsichtlich ihrer $\overline{P_1P_r}$-Längen "homogen", wenn die $\overline{P_1P_r}$-Längen

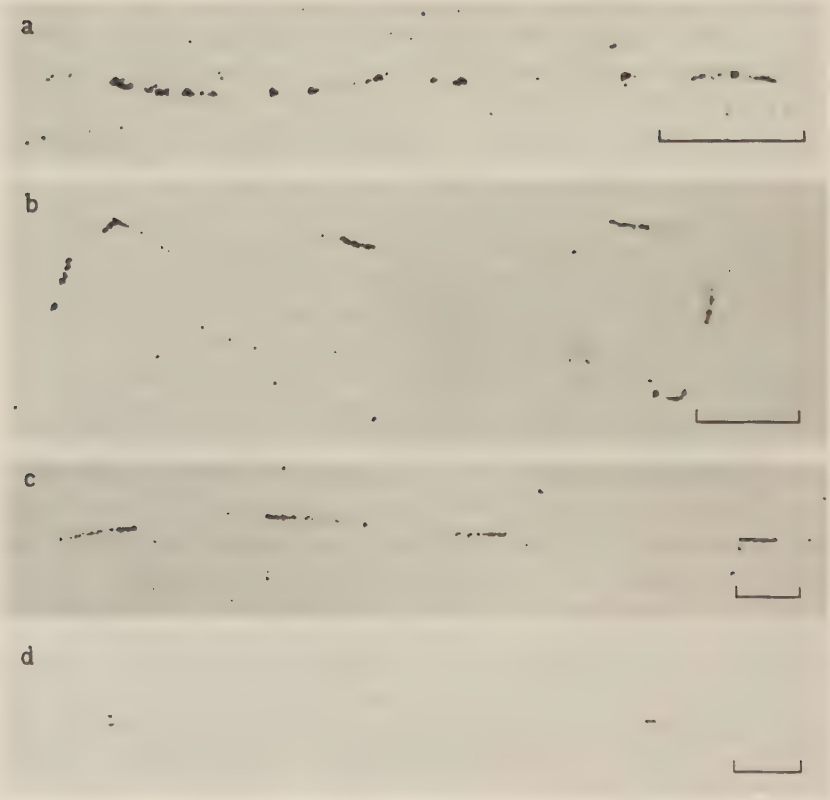


ABB.36

Legende zu ABB. 36:

Unterschiedliche Initiationsabfolgen entlang der DNS-Fadenmoleküle. (a) - (d) Variierende $\overline{P_l P_r}$-Längen (s. Legende ABB. 32) in ARG-Serien aus D.virilis Gehirnlysaten. Gehirne wurden nach Protokoll a (ABB. 3) pulsmarkiert. Die $\overline{P_l P_r}$-Länge in (d) beträgt 194 µm. (c) ist eine Ausschnittsvergrößerung von ABB. 33a. 7 Monate exponiert. Maßstab 25 µm.

innerhalb einer Bandbreite von 20 µm liegen; d.h., eine Asynchronie bis zu 10 µm pro RA, bidirektionale Replikation vorausgesetzt, wird toleriert. Dies entspricht einem Zeitintervall in der Initiation der Replikationsgabeln von ungefähr 30 Min. (v_{RG} mit 0,35 µm x Min.$^{-1}$ angenommen, s. III.5.3.1.). Von 66 untersuchten ARG-Serien entsprachen nur 27 dem oben definierten Homogenitätskriterium, d.h. 41%. Verringert man die Bandbreite auf 10 µm, so finden sich nur noch 14 "homogene" ARG-Serien, d.h. 21%. Selbst bei der relativ großen Bandbreite von 20 µm fallen, wie oben gezeigt, weniger als 50% der ARG-Serien in die "homogene" Klasse. Da die Heterogenität der Werte innerhalb der ARG-Serien zu groß erschien, wurde keine Varianzanalyse durchgeführt. Unter den gewählten Restriktionen sprechen die oben dargestellten Befunde gegen ein generelles, in ausgeprägter Synchronie ablaufendes Initiationsverhalten räumlich zusammenliegender Replicons (duchschnittliche ARG-Serien-Länge 130 µm). Die Tatsache jedoch, daß bei der verringerten Bandbreite von 10 µm (entspricht ungefähr einem 15 Min. Zeitintervall) noch ungefähr $^1/_5$ aller ARG-Serien das "Homogenitätskriterium" erfüllen, deutet an, daß es möglicherweise Subpopulationen von "Replicongruppen" gibt, die innerhalb einer geringen Bandbreite initiieren. Mit Ausnahme einer ARG-Serie fielen diese in die $\overline{P_1P_r}$-Längenklasse von 0 - 10 µm.

Werden alle erfaßten $\overline{P_1P_r}$-Längen in Klassen der Klassenbreite 50 µm eingeteilt (s. TABELLE 16), so fallen fast 90% aller $\overline{P_1P_r}$-Längen in die Gruppe 0 - 50 µm, während nur 1% der größten (250 - 300 µm) angehören. Bei bidirektionaler Replikation und einer angenommenen Replikationsrate v_{RG} = 0,35 µm x Min.$^{-1}$ (s. III.5.3.1.), beträgt die maximale Zeitdifferenz in der Initiation von 90% der $\overline{P_1P_r}$-Längen 71 Min.; d.h., 90% aller untersuchten Repliconorigins initiieren innerhalb von etwas über einer Std.. Die $\overline{P_1P_r}$-Ergebnisse der TABELLE 16 sind losgelöst aus dem jeweiligen ARG-Serien-Zusammenhang gruppiert. Sie spiegeln somit zwar die Grundtendenz aller erfaßbaren Replicons wieder, zur Bestimmung möglicher absoluter Zeitdifferenzen in der Initiation der Replicons bedarf es jedoch des linearen Zusammenhangs entlang einer ARG-Serie. Andererseits ist die Spannweite der $\overline{P_1P_r}$-Längen

TABELLE 16: $\overline{P_l P_r}$-Längen von D.virilis Gehirnen gruppiert in Klassen der Klassenbreite 50 µm

Klassen in µm						
0–50	50–100	100–150	150–200	200–250	250–300	Summe
340	32	7	3	0	2	384
(89%)	(8%)	(2%)	(1%)	(0%)	(1%)	(101%)

$\overline{P_l P_r}$-Längen von D.virilis Gehirnlysaten. Gehirne wurden nach Versuchsprotokoll a (ABB. 3) für 10 Minuten pulsmarkiert (s. MATERIAL UND METHODEN). Alle gemessenen $\overline{P_l P_r}$-Längen dieses Zeitwertes wurden in Klassen der Klassenbreite 50 µm aufgeteilt. Die in Klammern stehenden Prozentwerte sind die Quotienten aus den absoluten Häufigkeiten der einzelnen Klassen und der Summe aller Häufigkeiten in Prozent. Die 101% entstanden durch Rundungen.

natürlich mit eine Konsequenz der vorgegebenen Repliconlängen. $\overline{P_1P_r}$-Längen und O.-O.-Längen wurden unter denselben Annahmen der Origin-Lokalisation bestimmt. Insofern sollten beide Verteilungen gewisse Ähnlichkeiten aufweisen. Die längste gemessene $\overline{P_1P_r}$-Länge aller Pulsmarkierungsversuche in D. virilis Gehirnen betrug 336 µm; in derselben ARG-Serie maß die kleinste $\overline{P_1P_r}$-Länge 33 µm (s. ABB. 33d). Unter den obigen Annahmen und einer Replikationsrate von 0,35 µm x Min.$^{-1}$ würde dies Zeitintervallen von 8 Stdn., bzw. 47 Min. entsprechen; d.h., der Unterschied in der Initiation innerhalb dieser ARG-Serie betrüge ungefähr 7 Stdn. (s.a. DISKUSSION).

5.1.6. Termination der Replicons

In der Definition der Replicons von JACOB und BRENNER (1963), für Prokaryoten aufgestellt, besteht ein Replicon aus einem DNS-Abschnitt, der einen Replikationsorigin (réplicateur) enthält und einem "Initiator-Genprodukt"; d.h., die strukturelle Definition des Replicons beinhaltet nur den Origin. Das Problem der Termini stellte sich für die Prokaryoten zunächst nicht, da Episom wie Bakterienchromosom jeweils ein ringförmiges, vollständiges Replicon an sich darstellen.

Bei Eukaryoten dagegen ist das DNS-Äquivalent eines Chromosoms in viele Replicons gegliedert. Somit stellt sich das Problem, welche Individualität besitzt ein Replicon, bzw. wie grenzt sich ein Replicon vom benachbarten ab. Zwei Modellvorstellungen bieten sich an: (i) Die Längsgliederung eines DNS-Fadens mit dem DNS-Äquivalent eines Eukaryoten-Chromosoms beschränkt sich ausschließlich auf die Verteilung der Origins. Ein Eukaryoten-Replicon wäre somit in seiner Länge definiert durch den Spielraum, den sich die benachbarten, konvergierenden RAs zugestehen; d.h., die Replicongröße wäre festgelegt durch die Verteilung und zeitliche Aktivierung der Origins, einheitliche Replikationsraten für alle Wachstumspunkte vorausgesetzt. (ii) Jeder Origin ist beidseitig begrenzt von praefixierten Terminationsstellen, die den Kettenabbruch induzieren. Das Modell (i) hat den Vorteil, daß es nur

eine vorgegebene Determinante braucht, den Origin, der auch noch unterschiedlich aktivierbar sein könnte. Das Verdopplungssystem besäße somit eine große Flexibilität. Modell (ii) hätte dagegen außer dem Origin noch zwei weitere Fixpunkte, die dem Replicon den Rang einer eindeutig definierten subchromosomalen Einheit geben würde. Das DNS-Äquivalent des Eukaryoten-Chromosoms wäre demzufolge ein Faden aus vielen verknüpften Verdopplungseinheiten, den Eukaryoten-Replicons.

Um die Frage der Termination zu klären, wurden D. virilis Gehirne nach Versuchsprotokoll b (ABB. 3) pulsmarkiert. Einem kurzen, warmen Puls von 5 Min. folgte ein sehr langer, heißer Puls von 4 Stdn. . Die Dauer des zweiten Pulses war so bemessen, daß die RAs eines initiierten Replicons durchschnittlicher Länge von Pulsbeginn bis zu den Terminationsorten, T oder T* (s. Legende ABB. 32), durchmarkiert werden sollten. 4 Stdn. Pulsdauer entspricht bei einer angenommenen Replikationsrate von 0,35 µm x Min^{-1} (s. III.5.3.1.) einer RA-Länge von 84 µm. Erstaunlicherweise fanden sich jedoch ARG-Serien mit Doppelpuls-ARGs, deren zweite Pulsmarkierung abrupt, lange vor der maximal möglichen Pulslänge, abbricht (s. ABBn. 37a-d und 38a-c). Meistens sind die Pulsmarkierungen des zweiten Pulses (heißer Puls) innerhalb der ARGs unterschiedlich lang. Die Längen der in ABB. 37a-d dargestellten zweiten Pulsmarkierungen variieren von 1,6 - 46,3 µm, und die längste zweite Pulsmarkierung entspricht mit 46,3 µm (s. ABB. 37d) ungefähr der halben Länge, die ein Wachstumspunkt unter diesen Bedingungen zurücklegen könnte. Ein Fall von deutlicher Asymmetrie in der Reichweite des zweiten Pulses ist in ABB. 38c abgebildet. Er erinnert stark an die asymmetrischen Replicons in ABB. 34g,h.

Neben diesen ARGs mit abrupter Termination fanden sich auch ARGs mit konvergierender Pulsmarkierung und fusionierten Enden; z.B. ABB. 37e.Beide Formen - abrupter Abbruch oder Fusion der zweiten Pulsmarkierungen - fanden sich auch nebeneinander in einer ARG-Serie (Abb. 38a,b). Da der Anfangspuls im Vergleich zu dem Folgepuls von 4 Stdn. sehr kurz war, fanden sich auch ARG-Serien ganz ohne erste Pulsmarkierung, die also erst während des zweiten Pulses initiiert hatten (ABB. 37f). Aufgrund der Abwesenheit des

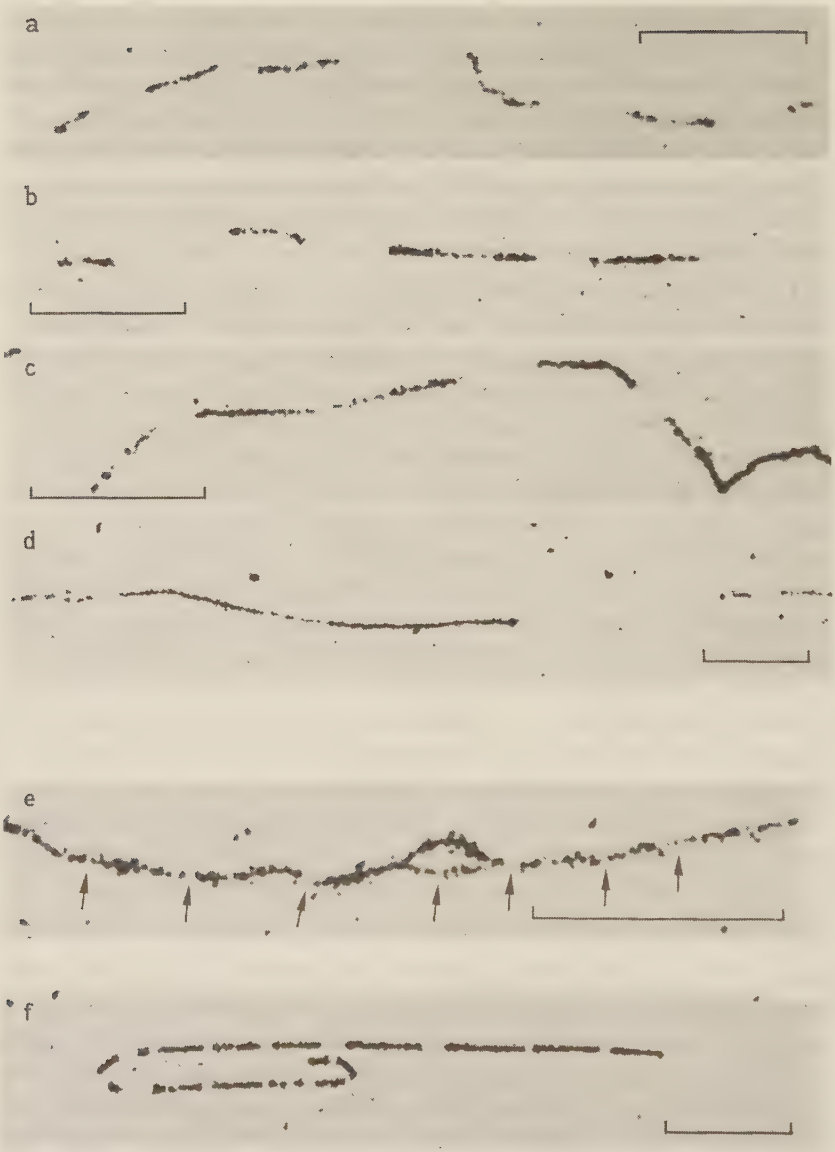


ABB.37

Legende zu ABB. 37:

Praefixierte Terminationsstellen. ARG-Serien aus D.virilis Gehirnlysaten. Die Gehirne wurden pulsmarkiert nach Versuchsprotokoll b (ABB. 3). Auf den ersten Puls, warmer Puls (9 Ci/mmol) von 5 Min. folgte der zweite Puls, heißer Puls (55 Ci/mmol) von 4 Stdn.. Die spezifischen Aktivitäten zwischen warmem Puls und heißem Puls unterschieden sich um den Faktor 6 (s. MATERIAL und METHODEN). 8 Monate exponiert. Maßstab 25 µm.

a) - (d) enthält ARG-Serien mit ARGs, deren Mitten von dem warmen Puls schwach markiert wurden, während sie an beiden Seiten flankiert werden von der heißen Puls-Markierung des zweiten Pulses. Die Pulsmarkierungen (heißer Puls) des zweiten Pulses enden abrupt. Innerhalb der einzelnen ARGs sind die linken und rechten Pulslängen der zweiten Pulse (heißer Puls) meistens unterschiedlich lang. Die Spannweite in den Längen der Pulsmarkierungen des zweiten Pulses (heißer Puls) in den dargestellten ARGs geht von 1,6 - 46,3 µm. Der längste gemessene Wert mit 46,3 µm entspricht ungefähr der halben DNS-Länge, welche ein Wachstumspunkt unter den gegebenen Bedingungen zurücklegen könnte (Inkubationszeit 240 Min.).

e) Alle Pulsmarkierungen des zweiten Pulses (heißer Puls) sind fusioniert. Die O.-O.-Längen, gemessen von warmer Pulsmarkierung Mitte zu Mitte, sind alle < 20 µm. Das "Auge" in der Fadenmitte wird von Tochtersträngen unterschiedlicher Markierungsintensität gebildet. Der obere Tochterstrang ist stärker markiert.

f) ARG-Serie, deren ARGs keine erste Pulsmarkierung (warmer Puls enthalten. Alle ARGs sind < 20 µm.

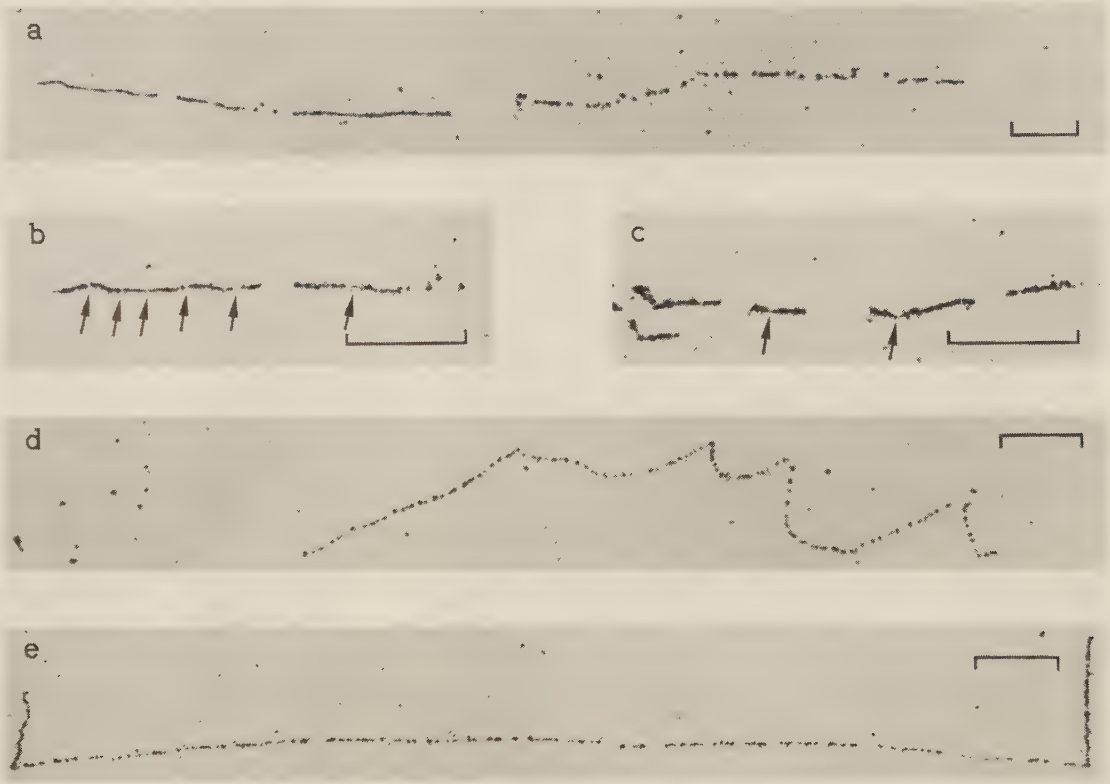


ABB.38

Legende zu ABB. 38:

Praefixierte Terminationsstellen. ARG-Serien aus D.virilis Gehirnlysaten. D.virilis Gehirne wurden nach Versuchsprotokoll b (ABB. 3) pulsmarkiert. Auf einen ersten Puls, warmer Puls (9 Ci/mmol), von 5 Min. folgte der zweite Puls, heißer Puls (55 Ci/mmol), von 4 Stdn.. Beide Pulse unterschieden sich in ihren spezifischen Aktivitäten um den Faktor 6. 8 Monate exponiert. Maßstab 25 µm.
a) ARG-Serie mit längeren, fusionierten ARGs (links) und kurzen unregelmäßigen (rechts).
b) Ausschnitt von (a). Die beiden linken ARGs aus (a) sind stärker herausvergrößert. Pfeile weisen auf die Pulsmarkierung des ersten Pulses (warmer Puls). Während das linke ARG vermutlich 5 Replicons enthält, besteht das rechte ARG nur aus einem.
c) ARGs mit asymmetrischer zweiter Pulsmarkierung (heißer Puls). Die zweiten Pulsmarkierungen links der ersten Pulsmarkierung, warmer Puls (Pfeile), sind jeweils kleiner als die rechten (vgl. a. ABB. 34g, h).
d) und (e) Lange ARG-Serien mit sehr kurzen bzw. unregelmäßigen ARGs (vgl. a. ABB. 35e, f).

ersten Pulses läßt es sich nicht entscheiden, ob die ARGs aus einem RA, bzw. zwei fusionierten hervorgingen.

Schließt man artifiziellen Kettenabbruch aus, so lassen sich die ARG-Serien nur unter der Annahme praefixierter Termini (T) im Sinne der in ABB. 32 unter der Alternative B dargelegten Hypothese interpretieren. Die nicht markierten Lücken müssen entweder schon vor Pulsgabe replizierte Repliconabschnitte enthalten haben, oder sie enthalten während der Pulszeit nicht replizierte Repliconabschnitte. Ob praefixierte Termini nur für eine Subpopulation von Replicons typisch sind, oder ein allgemeines Prinzip der Repliconstruktur darstellen, müssen weitere Untersuchungen zeigen. ARG-Formen wie in ABBn. 37e und 38a,b (erstes ARG) lassen sich sowohl im Sinne der Terminationshypothese A als auch B (ABB. 32) interpretieren. Situationen wie in ABB. 38a,b können auch im Sinne eines gemeinsamen Vorkommens von Termination T und T^* (ABB. 32) gedeutet werden.

Aus den Sequenzierungsbefunden von GALL und ATHERTON (1974) ergibt sich ein durchschnittliches dT-Verhältnis für H- : L-Stränge der drei DNS-Satelliten in D. virilis von ungefähr 3:1. Bei ausschließlicher ^{3}H-dThd Markierung sollten die Tochterstränge der Satelliten-DNS unterschiedliche Markierungsintensität zeigen (s.a. STEINEMANN, 1976), vorausgesetzt natürlich, die Autoradiographiebedingungen sind so gewählt, daß sich beide Körnchendichten nicht in der Sättigung befinden. Eine Augenstruktur, deren Tochterstränge die für die D. virilis Satelliten-DNS geforderten Eigenschaften zeigt, vorausgesetzt es handelt sich hier nicht um eine zufällige laterale Aggregation zweier unabhängiger DNS-Fäden, enthält der in ABB. 37e dargestellte DNS-Faden. Der obere Tochterstrang ist stärker markiert als der untere. Die Repliconlängen dieses Fadens, gemessen von Puls-Mitte zu Puls-Mitte, sind alle < 20 µm. Diese Längenbefunde sind kongruent mit der Vermutung, daß es sich bei dem in ABB. 37e dargestellten Faden um Satelliten-DNS handeln könnte.

Auch die nach Versuchsprotokoll b (ABB. 3) pulsmarkierten Gehirne enthalten DNS-Fäden, die unregelmäßige, bzw. diffuse Markierung zeigen (ABB. 38d,e). Diese Markierungsmuster können nur so interpretiert werden, daß viele Replikationsorigins dicht nebenein-

ander in unregelmäßiger Anordnung aufgereiht sind (vgl. auch ABB. 35e,f und s. DISKUSSION).

5.2. DNS-Fadenautoradiogramme von Speicheldrüsenlysaten

Speicheldrüsen des 3. Larvenstadiums wurden, wie in MATERIAL UND METHODEN beschrieben, entnommen, inkubiert und DNS-Fadenautoradiographien angefertigt. Die 5- und 10-Min.-Pulswerte ergaben keine eindeutigen Markierungsmuster. Eine Übersicht eines unvollständig lysierten Speicheldrüsenkerns der 10-Min.-Serie zeigt ABB. 39a. In den teilweise ausgespreiteten Oligotänbündeln ist nur diffuse Markierung zu erkennen. Die kompakteren Teile der Riesenchromosomen-"Reste" zeigen an einigen Stellen die schraubige Verdrillung der DNS-Fäden, bzw. deren Aggregate um die Chromosomenachse (s. BEERMANN, 1962). Anders dagegen die ausgespreiteten DNS-Fäden in ABB. 39b (120-Min.-Serie). DNS-Fäden entspringen einem unvollständig gespreiteten Riesenchromosom, bzw. Riesenchromosomen-Aggregat; zahlreiche ARG-Serien sind sichtbar. Insgesamt fanden sich in den DNS-Fadenautoradiographien der Speicheldrüsen nicht so viele gut gespreitete ARG-Serien wie in den Gehirnen.

In dem untersuchten Speicheldrüsenmaterial wurden keine unidirektionalen ARGs gefunden, d.h., die untersuchten doppelpulsmarkierten ARGs waren mit der Annahme einer bidirektionalen Replikationsrichtung verträglich.

5.2.1. Replikationsrate der Wachstumspunkte

Speicheldrüsen von D. virilis wurden nach Versuchsprotokoll a pulsmarkiert (ABB. 3). Die Auswertung der DNS-Fadenautoradiographien ergab wie erwähnt für die kürzesten Pulse, 5 und 10 Min., keine distinkten Markierungsmuster. Erst ARGs der 30-Min.-Serie enthielten meßbare Doppelpulsmarkierungen des Typs "heiß-kalt" (ABB. 40a-e). Es wurden erste Pulsmarkierungen mit distinktem Pulsbeginn ausgemessen, deren Enden durch die zweite Pulsmarkierung geringer Intensität flankiert waren. Die Vertei-

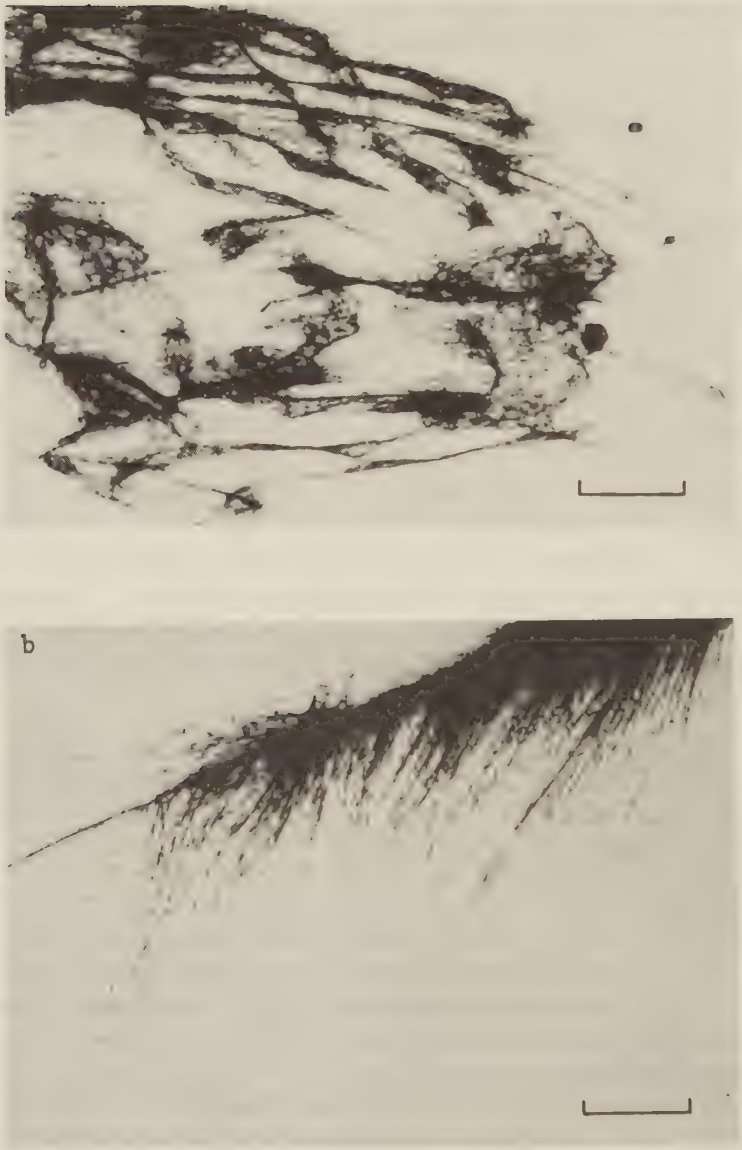


ABB.39

Legende zu ABB. 39:

Übersicht. Speicheldrüsen von D.virilis entsprechend Versuchsprotokoll a (ABB. 3) pulsmarkiert. 7 Monate exponiert. Maßstab 100 µm.
a) Unvollständig lysierter Speicheldrüsenkern aus der 10 Min. heißer Puls - kalter Puls Serie (s. MATERIAL und METHODEN). In den kompakteren Teilen der "Riesenchromosomen - Reste" läßt sich häufig die schraubige Verdrillung der DNS-Fäden bzw. deren Aggregate erkennen (s. BEERMANN, 1962).
b) Ausgespreitete DNS-Fäden, die einem Riesenchromosom oder einem Riesenchromosomen-Aggregat entspringen.

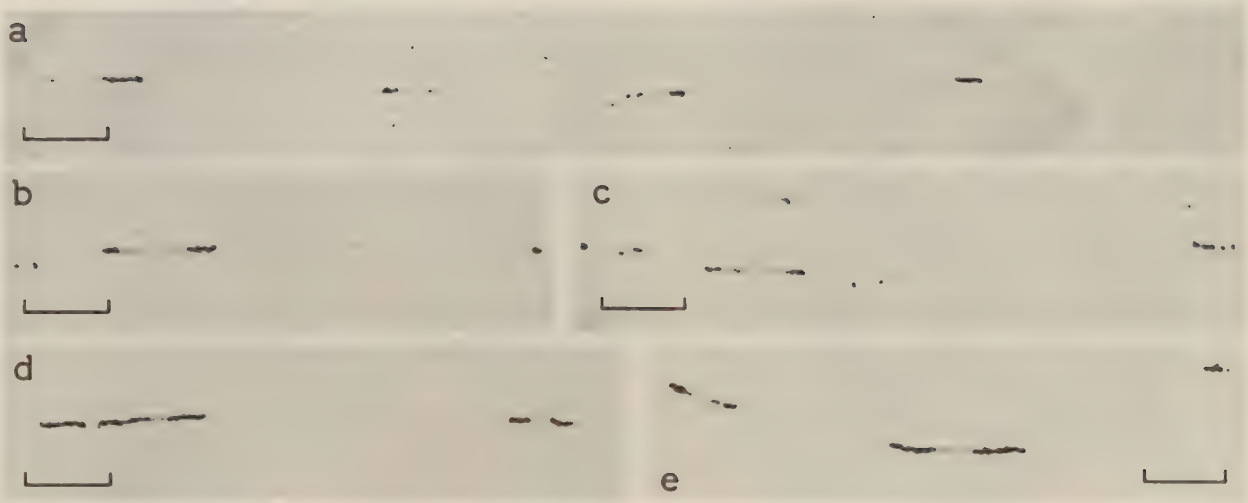


ABB.40

Legende zu ABB. 40:

Markierungsspuren verschieden langer Pulszeiten (heißer Puls) aus D.virilis Speicheldrüsenlysaten. Die Pulsmarkierung der Speicheldrüsen erfolgte nach Versuchsprotokoll a (ABB. 3). Während die Pulszeiten des ersten Pulses, heißer Puls, variiert wurden, blieb die Zeit des zweiten Pulses, kalter Puls, konstant. 7 Monate exponiert. Maßstab 20 µm.

a) 30 Min. Puls

b) und (c) 60 Min. Puls

d) und (e) 120 Min. Puls

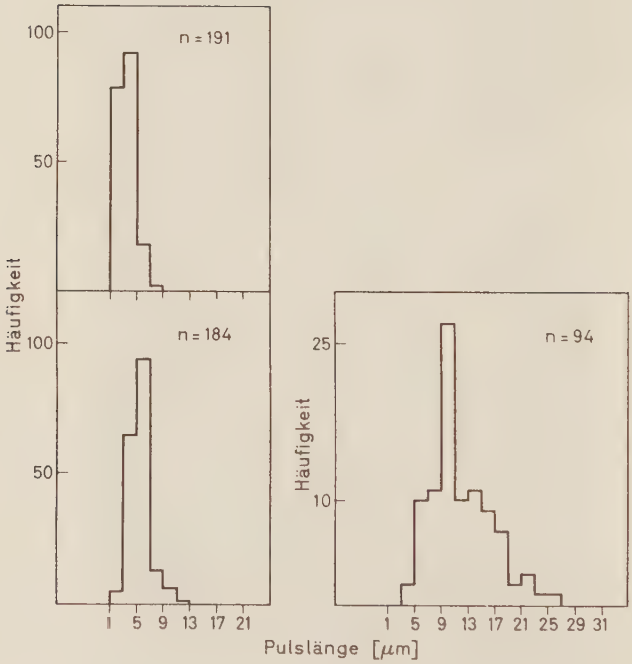

n = 191
n = 184
n = 94
100
50
25
10
Häufigkeit
1 5 9 13 17 21
1 5 9 13 17 21 25 29 31
Pulslänge [μm]

ABB.41

Legende zu ABB. 41:

Verteilung der Längen der Markierungsspuren (heißer Puls) aus D.virilis Speicheldrüsenlysaten. Es wurden alle erste Pulsmarkierungen (heißer Puls) ausgemessen, deren Anfänge mit einer distinkten Markierungsstufe einsetzten und deren Enden markiert wurden durch den Beginn der Pulsmarkierung mit geringer Intensität, zweiter Puls (s. ABB. 40). Die gemessenen Werte wurden in Klassen eingeteilt. Die Klassenbreite beträgt 2 µm.
Oben links: 30 Min. Puls (n = 191)
Unten links: 60 Min. Puls (n = 184)
Unten rechts: 120 Min. Puls (n = 94)

TABELLE 17: Mittlere Pulslängen aus D.virilis Speicheldrüsen

Pulsdauer in Minuten	n	s in µm	$\bar{x}$ in µm	v_{RG} in µm x Min.$^{-1}$
30	191	1,4	3,4	0,11
60	184	1,6	5,5	0,09
120	94	4,1	12,1	0,10

Mittlere Pulslängen von D.virilis Speicheldrüsen, welche nach Versuchsprotokoll a (ABB. 3) pulsmarkiert wurden. n: Stichprobenumfang; s: Standardabweichung der Stichproben; $\bar{x}$: Stichprobenmittelwert; v_{RG}: Geschwindigkeit der Wachstumspunkte (Replikationsgabeln) der Replikationsabschnitte (RAs).

lungen der gemessenen, in Klassen der Klassenbreite 2 µm eingeteilten Werte sind in ABB. 41 dargestellt. Wie die Histogramme deutlich machen, streuen die Speicheldrüsen-Pulslängenwerte der 30- und 60-Min.-Serie um weit geringere Mittelwerte als die Pulslängen der entsprechenden Zeiten in den Gehirnen (vgl. ABB. 29). In TABELLE 17 sind die Mittelwerte dargestellt. Die gefundenen Replikationsraten (v_{RC}) rangieren über den engen Bereich von 0,09 µm x Min.$^{-1}$ bis 0,11 µm x Min.$^{-1}$. Sie liegen alle deutlich unter den für die Gehirne erhaltenen Replikationsraten.

5.2.2. Länge der Replicons

Für die Bestimmung der Repliconlängen in D. virilis Speicheldrüsen wurden die DNS-Fadenautoradiogramme der 120-Min.-Serie verwendet. Wie bei den Gehirnen fanden sich auch hier zwei ARG-Typen: (i) ARGs mit Doppelpulsmarkierung, wobei der heiße Anfangspuls von der zweiten schwächeren Pulsmarkierung flankiert wird (ABB. 42a-c). (ii) ARGs nur mit heißer Pulsmarkierung (ABB. 42d). Die O.-O.-Längen wurden nicht nach ARG-Typen getrennt erfaßt. Sie zeigen eine positiv schiefe Verteilung (ABB. 43 oben) mit einem Medianwert von 39,5 µm (s.a. TABELLE 18). Die Werte der in dieser Versuchsserie gemessenen O.-O.-Längen reichen von 5 µm - 203 µm. In ABB. 43 unten sind die pro Klasse verdoppelten DNS-Längen dargestellt. Der Medianwert der Verteilung beträgt 64,1 µm; d.h., 50% der ausgemessenen DNS-Längen werden von Replicons $\leq$ 64,1 µm verdoppelt und 75% werden von Replicons $\leq$ 80,9 µm (Q_3-Wert aus TABELLE 22) repliziert. Sowohl der Medianwert der reinen Häufigkeiten der O.-O.-Längen als auch der Medianwert der pro Klasse verdoppelten DNS-Längen liegen höher in den Speicheldrüsen als in den Gehirnen, wobei der Unterschied der letzteren relativ gering ist (s. III.5.3.2. und DISKUSSION). Wie aus TABELLE 18, Spalte R, ersichtlich, betrug die längste gemessene O.-O.-Länge 203 µm (s.a. ABB. 44c). Bei bidirektionaler Replikation und einer angenommenen Replikationsrate von 0,1 µm x Min.$^{-1}$ würde ein Replicon dieser Größe ungefähr 17 Stdn. zur Replikation benötigen.

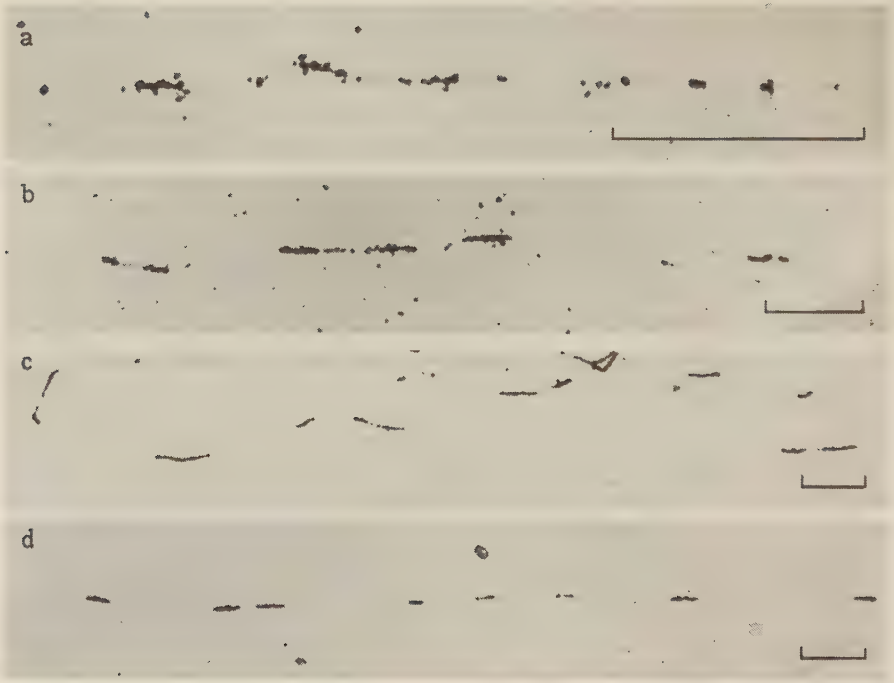


ABB.42

Legende zu ABB. 42:

ARG-Serien verschiedener Zeitwerte aus D.virilis Speicheldrüsenlysaten. Die Speicheldrüsen wurden nach Versuchsprotokoll a (ABB. 3) pulsmarkiert. 7 Monate exponiert. Maßstab 25 µm.
a) - (c) ARG-Serien mit ARGs, die sowohl die Doppelpulsmarkierung zeigen, erster Puls (heißer Puls) und zweiter Puls (kalter Puls), als auch ARGs, die nur Pulsmarkierung des ersten Pulses, heißer Puls, enthalten (vgl. a. ABB. 30a - c).
d) ARG-Serie mit ARGs, welche nur die erste Pulsmarkierung (heißer Puls) enthalten (vgl. a. ABB. 30g).

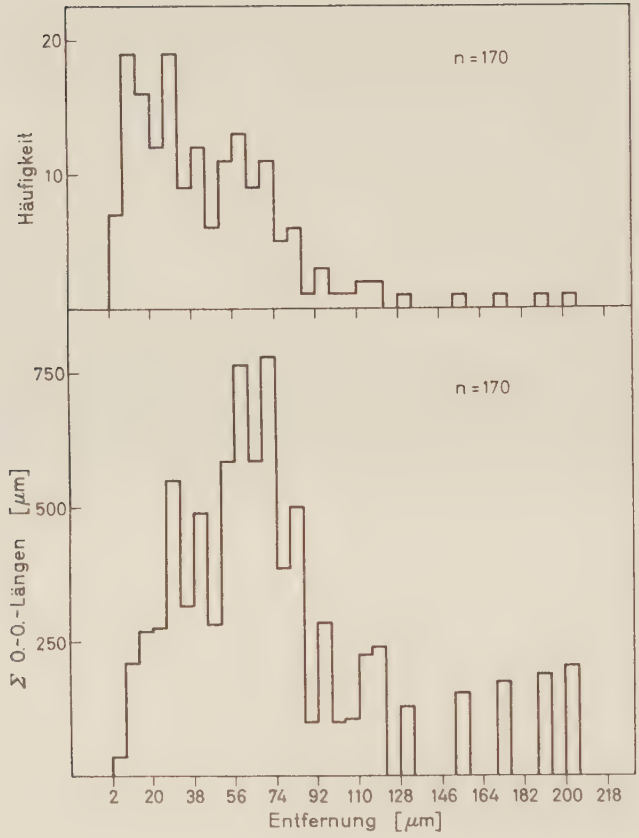

20
10
Häufigkeit
n = 170
750
500
250
Σ O-O-Längen [μm]
n = 170
2 20 38 56 74 92 110 128 146 164 182 200 218
Entfernung [μm]

ABB.43

Legende zu ABB. 43:

Verteilung der Origin-Origin-Längen aus D.virilis Speicheldrüsenlysaten. Die Speicheldrüsen wurden 120 Min. nach Versuchsprotokoll a (ABB. 3) pulsmarkiert. Der Origin eines Replicons wurde jeweils in der Mitte der $\overline{P_l P_r}$-Längen angenommen. Die Entfernungen zwischen benachbarten Origins (O.-O.) wurden bestimmt (s. MATERIAL und METHODEN und ABB. 32) und die gemessenen Längen in Klassen mit der Klassenbreite 6 µm eingeteilt.

Oben: Verteilung der O.-O.-Längen. Es wurden die Längen zwischen allen ARGs ausgemessen; es blieb unberücksichtigt, ob die ARGs Doppelpulsmarkierung oder nur Pulsmarkierung des ersten Pulses (heißer Puls) zeigten (s. a. Legende zu ABB. 31). Die Verteilung ist positiv schief und weist einen exzessiv entwickelten positiven Auslauf auf. Medianwert der Häufigkeitsverteilung 39,5 µm (s. a. TABELLE 18).

Unten: Replizierte DNS-Längen (Σ O.-O.-Längen pro Entfernungsklasse). Klassenbreite 6 µm. Σ O.-O.-Längen pro Klasse wurden erhalten durch Multiplikation der Klassenmitten mit den Häufigkeiten dieser Klasse (s. a. TABELLE 19). Medianwert der Verteilung 64,1 µm.

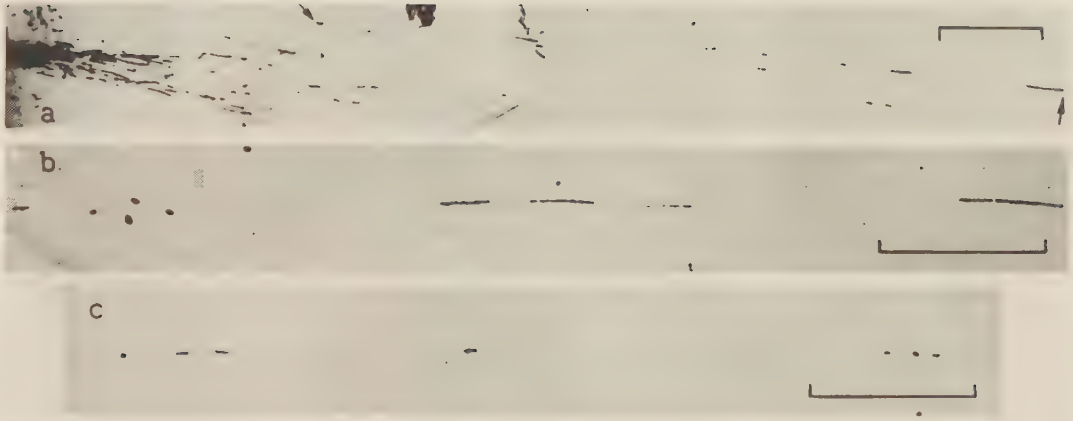


ABB.44

Legende zu ABB. 44:

Lange ARG-Serien aus D.virilis Speicheldrüsenlysaten.

Speicheldrüsen wurden nach Protokoll a (ABB. 3) pulsmarkiert. 7 Monate exponiert. Maßstab 100 µm.

a) Von einem Fadenaggregat (links), vermutlich Riesenchromosomen-Rest, wurden DNS-Fäden ausgespreitet. Die ARG-Serie, die sich vom rechten Bildrand bis links oben erstreckt (Pfeile) ist 720 µm lang.

b) ARG-Serie ist 625 µm lang. Die $\overline{P_l P_r}$-Längen links und rechts des mittleren ARGs betragen 243,6 µm und 159,6 µm. Der zentrale Puls des mittleren ARGs, beidseitig von Pulsmarkierungen geringer Intensität flankiert, ist > 2 PL. Gleichfalls > 2 PL sind die Außenpulse, welche zu den $\overline{P_l P_r}$-Lücken abrupt abbrechen (vgl. a. ABB. 34c).

c) ARG-Serie mit 2 ARG-clusters, welche durch ein ARG in der Mitte verbunden sind. Alle ARGs zeigen nur eine Pulsmarkierung (heißer Puls). Die $\overline{P_l P_r}$-Längen links und rechts des mittleren ARGs betragen 142,1 µm bzw. 247,4 µm. Alle ARGs sind < PL, wobei die 3 ARGs des rechten clusters kleiner sind als die 2 des linken. Gesamtlänge der ARG-Serie 456 µm (vgl. a. ABB. 30h).

TABELLE 18: Repliconlängen (O.–O.–Längen) aus D.virilis Speicheldrüsen

O.–O.–Längen	R[1] in µm	$\tilde{x}$[2] in µm	Q_1[3] in µm	Q_3 in µm	n[4]
Längen vereinigt[5]	5 – 203	39,5	18,3	60,8	170

[1]R, Spannweite; [2]$\tilde{x}$, Median der Stichprobe; [3]Q_1, unteres Quartil; Q_3, oberes Quartil; [4]n, Stichprobenumfang. [5]Bei der O.–O.–Längenmessung wurde nicht zwischen ARGs mit nur Doppelpulsmarkierung bzw. mit nur erster Pulsmarkierung (heißer Puls) unterschieden. Die Verteilung entspricht formal TABELLE 14c.

Charakterisierung der O.–O.–Längenverteilung. D.virilis Speicheldrüsen wurden nach Versuchsprotokoll a (ABB. 3) für 120 Minuten pulsmarkiert. Aus den DNS–Fadenautoradiographien wurden die Origin–Origin–Entfernungen bestimmt (s. MATERIAL UND METHODEN und Text), wobei die Origins jeweils in der Mitte der $\overline{P_l P_r}$–Längen angenommen wurden.

TABELLE 19: Replizierte DNS-Länge pro Repliconklasse (18µm) in D.virilis Speicheldrüsen

Gruppierte O.-O.-Intervalle (Replicons) in µm	Absoluter Längenanteil in µm	Relativer Längenanteil in %
2 - 20	516	6,5
20 - 38	1142	14,4
38 - 56	1357	17,1
56 - 74	2133	26,9
74 - 92	972	12,3
92 - 110	493	6,2
110 - 128	464	5,9
128 - 146	131	1,7
146 - 164	155	2,0
164 - 182	173	2,2
182 - 200	191	2,4
200 - 218	203	2,6
Summe	7 930	100,2

Die O.-O.-Längen der Verteilung ABB. 43, Oben, wurden in Klassen der Klassenbreite 18µm eingeteilt. Der absolute Längenanteil (Σ O.-O.-Längen) wurde durch Multiplikation der Klassenmitten mit den Klassenhäufigkeiten erhalten. Die relativen Längenanteile errechneten sich aus den Quotienten der absoluten Längenanteile der einzelnen Klassen und der Gesamtlänge in Prozent. 100,2 % entstanden durch Rundungen.

5.2.3. Topographie der Replicons

DNS-Fadenautroadiographien von Speicheldrüsen zeigen im wesentlichen dieselben ARG-Muster wie sie auch in den Gehirnen gefunden wurden, außer daß DNS-Fäden mit unregelmäßiger, bzw. diffuser Markierung, wie sie in ABB. 35c-f dargestellt sind, nicht vorkommen. Auch fanden sich keine längeren ARG-Serien, die homogen mit sehr kurzen Replicons bestückt waren (vgl. ABB. 35a, b). So war auch die Gesamtzahl der gefundenen kleinen Replicons geringer als in den DNS-Fadenautoradiographien der Gehirne. In der Prüfung auf Homogenität der Repliconlängen innerhalb der 42 untersuchten ARG-Serien fand sich nur eine ARG-Serie mit 6 O.-O.-Längen, die alle < 20 µm waren. 4 ARG-Serien enthielten bis zu 2 O.-O.-Längen von knapp über 20 µm, während die restlichen alle < 20 µm waren. Alle übrigen kleinen O.-O.-Längen waren zwischen größeren eingestreut.

Für die Anordnungsmöglichkeiten der Replicons (vgl. III.5.1.4.) fanden sich auch in den Speicheldrüsen-ARG-Serien die entsprechenden Beispiele: zu (i) z.B. ABB. 42c, d; zu (ii) z.B. ABB. 44c und zu (iii) z.B. ABBn. 40d, 42a,b. Die Variante (ii) war wiederum selten. Deshalb wurden von den ARG-Serien aus Speicheldrüsen nur die beiden Alternativen (i) und (iii) mit dem in III.5.1.4. beschriebenen Verfahren der Varianzanalyse überprüft. Verwendet wurden Speicheldrüsen, die 120 Min. nach Versuchsprotokoll a pulsmarkiert waren. In den DNS-Fadenautoradiographien fanden sich 42 ARG-Serien mit mehr als einer O.-O.-Länge. Von diesen 42 ARG-Serien erfüllten 22 (52%) die gesetzten Bedingungen (s. III.5.1.4.). Die Durchschnittslänge der 42 ARG-Serien betrug 166 µm, die der als "homogen" selektionierten 22 ARG-Serien 113 µm. Mit den 52% wurde die Varianzanalyse durchgeführt. Da $\hat{F} = 5{,}08 > F_{(21,\ 55;0{,}05)}$ ist, muß die Nullhypothese auf dem 5% Niveau abgelehnt werden, d.h., die Repliconlängen der getesteten ARG-Serien (52%) sind jeweils innerhalb der ARG-Serien ähnlicher als die Repliconlängen der Gesamtheit aller Replicons. Die Speicheldrüsenreplicons sind in ihrer Größenanordnung der der Gehirne vergleichbar, d.h., Replicons ähnlicher Größe liegen eher in Gruppen zusammen (getestete ARG-Serienlängen, "Gruppenlängen", durchschnittlich 113 µm).

Die ARG-Serie in ABB. 44b enthält in der Mitte ein ARG, dessen Markierungsmuster ABB. 34c entspricht. Die mittlere, lange Pulsmarkierung (erster Puls) ist an beiden Seiten flankiert von zweiten Pulsmarkierungen geringer Intensität. Die jeweils nach außen anschließenden ersten Pulsmarkierungen brechen abrupt ab. Alle ersten Pulsmarkierungen sind > PL. Es ist deshalb zu vermuten, daß in der zentralen Pulsmarkierung zwei Origins im Verlauf des ersten Pulses initiiert haben und in den äußeren ersten Pulsmarkierungen jeweils einer. Der abrupte Abbruch ist entweder auf Termination T oder T^* zurückzuführen.

5.2.4. Initiationsabfolge der Repliconorigins

Zur quantitativen Bestimmung des Initiationsverhaltens wurden die $\overline{P_1P_r}$-Längen zwischen den Pulsanfängen verwendet (s. III.5.1.5. und ABB. 32). Auch für die Speicheldrüsen konnte nach Augenschein die Alternative (i) - alle Replicons initiieren synchron - ausgeschlossen werden (z.B. ABB. 42). Es wurde nun versucht, die Hypothese (ii) - alle Replicons initiieren asynchron - gegen (iii) - Replicongruppen in der Größe der ARG-Serien initiieren relativ synchron im Vergleich zur gesamten Repliconpopulation - nach dem in III.5.1.4. beschriebenen Verfahren zu testen. Die $\overline{P_1P_r}$-Längen wurden in 10 µm Klassen eingeteilt und die Häufigkeiten der $\overline{P_1P_r}$-Längen jeweils pro ARG-Serie aufgetragen. Von 42 untersuchten ARG-Serien entsprachen 6, d.h. 14% den Homogenitäts-Kriterien - alle ARG-Serien sind hinsichtlich ihrer $\overline{P_1P_r}$-Längen "homogen", wenn die $\overline{P_1P_r}$-Längen innerhalb einer Bandbreite von 20 µm liegen (vgl. III.5.1.5.). Der Prozentsatz der ARG-Serien, die nach dieser Definition "synchron" initiieren, liegt bei den Speicheldrüsen noch geringer als bei den Gehirnen. Wird die Bandbreite auf 10 µm reduziert, so erfüllen noch 2 ARG-Serien die Bedingung, d.h. 5%. Beide ARG-Serien fallen in die $\overline{P_1P_r}$-Längenklasse 0 - 10 µm. Eine Bandbreite von 20 µm bedeutet, bidirektionale Replikation vorausgesetzt, pro Wachstumspunkt 10 µm. Legt man eine Replikationsrate von 0,1 µm x $Min.^{-1}$ (s. III.5.3.1.) zugrunde, entspräche die Bandbreitentoleranz in den Speicheldrüsenwerten 100 Min..Auch für die

TABELLE 20: $\overline{P_1P_r}$-Längen von D.virilis Speicheldrüsen gruppiert in Klassen der Klassenbreite 50 µm

Klassen in µm						
0–50	50–100	100–150	150–200	200–250	250–300	Summe
147	30	5	4	2	0	188
(78%)	(16%)	(3%)	(2%)	(1%)	(0%)	(100%)

$\overline{P_1P_r}$-Längen von D.virilis Speicheldrüsenlysaten. Speicheldrüsen wurden nach Versuchsprotokoll a (ABB. 3) für 120 Minuten pulsmarkiert (s. MATERIAL UND METHODEN). Alle gemessenen $\overline{P_1P_r}$-Längen dieses Zeitwertes wurden in Klassen der Klassenbreite 50 µm aufgeteilt. Die in Klammern stehenden Prozentwerte sind die Quotienten aus den absoluten Häufigkeiten der einzelnen Klassen und der Summe aller Häufigkeiten in Prozent.

Speicheldrüsenwerte erschien die Heterogenität der $\overline{P_1P_r}$-Längen zu groß, und es wurde keine Varianzanalyse durchgeführt. Was für die $\overline{P_1P_r}$-Längen der Gehirne zutraf, gilt in verstärktem Maße für die Speicheldrüsenwerte. Unter den gewählten Restriktionen läßt sich kein sicherer Hinweis für die Existenz von ausgeprägter Synchronie in benachbarten Replicons erbringen.

Werden alle gemessenen $\overline{P_1P_r}$-Längen der 120-Min.-Serie in Klassen der Klassenbreite 50 µm gruppiert, so fallen 78% aller $\overline{P_1P_r}$-Längen in die 0 - 50 µm Klasse (s. TABELLE 20). Immerhin fallen noch 16% in die 50 -100 µm Klasse, während die 200 - 250 µm Klasse 1% enthält. Von den "synchronen" ARG-Serien fallen alle in die Klasse 0 - 50 µm.

Die 78% der $\overline{P_1P_r}$-Längen, die der Klasse 0 - 50 µm angehören, zeigen bei bidirektionaler Replikation und einer angenommenen Replikationsrate von 0,1 µm x Min.$^{-1}$ (s. III.5.3.1.) eine maximale Zeitdifferenz von 250 Min.; d.h., ungefähr 80% aller Initiationen der Speicheldrüsenreplicons von D. virilis erfolgen innerhalb einer maximalen Zeitdifferenz von ungefähr 4 Stdn. . Für die Gruppe der längsten $\overline{P_1P_r}$-Längen (1%), 200 - 250 µm, würde die maximale Zeitdifferenz 1250 Min., bzw. ungefähr 21 Stdn. betragen. In ABB. 44c ist eine ARG-Serie wiedergegeben, deren kleinster $\overline{P_1P_r}$-Abstand 7,9 µm, der größte 274,4 µm beträgt. Unter den obigen Annahmen bedeutet dies eine Replikationsdauer der RAs von 39,5 Min., bzw. 1237 Min. . Die Zeitdifferenz im Replikationsbeginn in dieser ARG-Serie betrüge demnach ungefähr 20 Stdn.; immer unter der Annahme von einem Origin pro $\overline{P_1P_r}$-Länge.

5.3. Gegenüberstellung der Ergebnisse der DNS-Fadenautoradiographien aus beiden D. virilis Organen: Gehirne und Speicheldrüsen

5.3.1. Replikationsraten der Wachstumspunkte

Die mittleren Pulslängen der Gehirne (s. TABELLE 13) und der Speicheldrüsen (s. TABELLE 17) wurden in das Weg-Zeit-

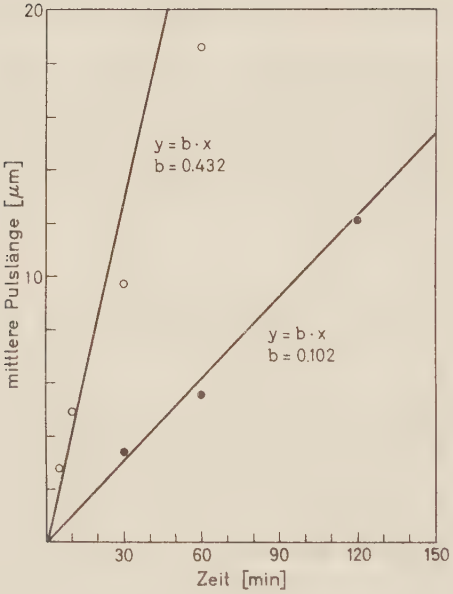

20
10
mittlere Pulslänge [μm]
y = b · x
b = 0.432
y = b · x
b = 0.102
30
60
90
120
150
Zeit [min]

ABB.45

Legende zu ABB. 45:

Weg - Zeit-Diagramm der mittleren Längen der Markierungsspuren (heißer Puls). Die mittleren Längen der Markierungsspuren ($\bar{x}$) von D.virilis Speicheldrüsen bzw. Gehirnen (TABELLE 13 und TABELLE 17) wurden gegen die entsprechenden Pulszeiten aufgetragen. Den Speicheldrüsen, bzw. Gehirnpunkten wurde jeweils eine Regressionsgerade[1] angepaßt. Die Steigung b der Regressionsgeraden (Regressionskoeffizient) entspricht hier der durchschnittlichen Wachstumsrate (v_{RG} in $\mu m \times Min.^{-1}$) in den Wachstumspunkten (Replikationsgabeln). Die mittlere Wachstumsrate ist in polytänen Speicheldrüsenchromosomen langsamer als in den mitotischen Chromosomen der Gehirne.

[1]Die Regressionsanalyse geht von der Annahme aus, daß die individuellen Beobachtungen unabhängig und normalverteilt um ihre entsprechenden Mittelwerte sind. Die Annahme der Normalverteilung ist nicht in allen Beobachtungsgruppen streng erfüllt. Aufgrund des Markoffschen Theorems jedoch (s. HALD, 1952) sind die oben erhaltenen Abschätzungen gültig, da für große Stichprobenumfänge, die Normalverteilungsannahme approximativ erfüllt wird.

Diagramm in ABB. 45 aufgetragen. Durch die jeweiligen Punktewolken wurde eine Regressionsgerade gelegt. Die Steigung b der Regressionsgeraden (Regressionskoeffizient) entspricht hier der durchschnittlichen Wachstumsrate in den Wachstumspunkten (v_{RG} in µm x Min.$^{-1}$). Der Regressionskoeffizient der Regressionsgeraden durch die Punktewolke der Gehirne-Werte beträgt b = 0,432 und der durch die Speicheldrüsenpunkte b = 0,102. Die mittlere Replikationsrate der Speicheldrüsen ist also deutlich geringer als die der Gehirne.

Meßfehler und die mögliche Verzögerung des Pulsstopps im Eis müssen sich bei den kurzen Pulslängen stärker auswirken als bei den längeren; andererseits fallen die 5- bzw. 10-Min.-Pulse in der Regressionsanalyse stärker ins Gewicht (kleiner Nenner und großer Zähler durch große Stichproben). Deshalb ist die Steigung b = 0,432 der Regressionsgeraden durch die Punktewolke der Gehirne sehr wahrscheinlich überschätzt. Legt man eine Regressionsgerade nur durch die 30- und 60-Min.-Pulswerte, so ergibt sich ein Regressionskoeffizient von b = 0,315. Da der letztere weniger abhängig ist von den genannten Fehlermöglichkeiten, wurde für die Gehirne b, bzw. v_{RG} mit 0,35 µm x Min.$^{-1}$ angenommen. Für das Verhältnis der Replikationsraten der Wachstumspunkte in Gehirnen und Speicheldrüsen ergibt sich damit: 0,35 : 0,1 = 3,5. Die Replikationsrate der Wachstumspunkte in den Speicheldrüsen ist demzufolge 3,5fach langsamer als die der Gehirne.

5.3.2. Länge und Topographie der Replicons

Wie sich aus den Histogrammen der Repliconlängen (O.-O.-Längen) oben und Mitte in ABB. 31 ableiten läßt, wird die Häufigkeitsverteilung der O.-O.-Längen in den Gehirnen vor allem durch den in ABB. 31 Mitte dargestellten ARG-Typ geprägt. Dies kommt gleichfalls klar zum Ausdruck in den Medianwerten in TABELLE 14: $\tilde{x}$ von a beträgt 52,2 µm (entspricht Häufigkeitsverteilung in ABB. 31 oben) und $\tilde{x}$ in b, 12,1 µm (entspricht Häufigkeitsverteilung in ABB. 31 Mitte) und $\tilde{x}$ in c, Gesamthäufigkeitsverteilung (nicht als Histogramm dargestellt), 21,0 µm. Der c entsprechende $\tilde{x}$ der Speicheldrüsen O.-O.-Längenverteilung ist

TABELLE 21: Vergleich der Klassenbesetzung der O.-O.-Längen zwischen Gehirnen und Speicheldrüsen von D.virilis

Klassen in µm	Häufigkeiten der O.-O.-Längen Speicheldrüsen	Gehirne
0 - 20	36	154
20 - 40	43	50
40 - 60	26	34
60 - 80	24	18
80 - 100	10	10
100	12	8
Summe	151	274

Die O.-O.-Längen der Gehirne und Speicheldrüsen, welche auch für die Varianzanalyse Verwendung fanden (nur ARG-Serien mit mehr als einer O.-O.-Länge) wurden in Klassen der Klassenbreite 20µm eingeteilt. Beide Verteilungen sind signifikant verschieden (χ^2-Test). Jedoch ergibt sich keine Signifikanz (α =0,05), wenn die 0 - 20 µm Klasse in den Test nicht miteinbezogen wird.

39,5 µm (s. TABELLE 18). Der augenscheinliche Hauptunterschied zwischen Gehirne und Speicheldrüsen liegt vor allem im Verteilungsbereich < 20 µm (s. z.B. ABB. 31 unten und ABB. 43 unten). Der Augenschein läßt sich untermauern durch den Vergleich der gruppierten O.-O.-Längen von Gehirnen und Speicheldrüsen (TABELLE 21) in einem Homogenitätstest (Chiquadrat-Test). Beide Verteilungen unterscheiden sich hochsignifikant auf dem 5% Niveau. Wird jedoch derselbe Vergleich ohne die 0 - 20 µm Klasse durchgeführt, so findet sich keine Signifikanz (α = 0,05).

Ein Großteil der kurzen Replicons in Gehirnen entstammt ARG-Serien, die relativ homogen mit diesem Replicon-Typ bestückt sind (s. z.B. ABB. 35a,b). Dieser Replicontyp ließ sich in den Speicheldrüsen praktisch nicht nachweisen (s. III.5.2.3.). Außerdem fanden sich in den Speicheldrüsen-Präparaten keine DNS-Fäden mit diffuser bzw. unregelmäßiger Markierung. Es ist nun interessant, daß keine der drei Satellitenfraktionen (I, II und III) in den polytänen Speicheldrüsen mitrepliziert werden (s. ABBn. 7, 12a,b und 19). Die Korrelation beider Befunde legt einen ursächlichen Zusammenhang nahe, d.h., einer dieser Replicontypen, oder beide, könnten die Verdopplungseinheiten der Satelliten-DNS darstellen (s. DISKUSSION). Die zahlreichen, "en bloc" auftretenden kurzen Replicons könnten für den Unterschied der Medianwerte der Repliconlängen in Gehirnen und Speicheldrüsen verantwortlich sein. Ein mit den Speicheldrüsen vergleichbarer Medianwert der Gehirne müßte um die kurzen "en bloc" Replicons bereinigt werden. Der bereinigte Wert sollte zwischen 21,0 µm und 52,2 µm liegen; er beträgt 31,0 µm (s. III.5.1.4.).

Weniger dominierend als in den reinen Häufigkeitsverteilungen fallen die kurzen, möglicherweise Satelliten-DNS verdoppelnden Replicons in der Auftragung der pro Klasse verdoppelten DNS-Mengen (Σ O.-O.-Längen) ins Gewicht[1]. Wie aus TABELLE 22 hervorgeht, zeigen die Medianwerte dieser Verteilungen keine so großen

---

[1] Daraus ist möglicherweise zu folgern, daß dieser Typ bei der quantitativen Erfassung entweder unterschätzt wurde oder daß der fehlende Anteil in den nicht ausmeßbaren DNS-Fäden mit diffusem Markierungsmuster enthalten ist, denn die Satellitenfraktionen umfassen 45% der Gesamt-DNS.

TABELLE 22: Pro Repliconklasse verdoppelte DNS-Längen in D.virilis Gehirnen und Speicheldrüsen

Organe	R^1 in µm	$\tilde{x}^2$ in µm	Q_1^3 in µm	Q_3 in µm	n^4
Gehirne	2 - 238	61,7	34,9	88,6	317
Speicheldrüsen	5 - 203	64,1	47,3	80,9	170

^1R, Spannweite; $^2\tilde{x}$, Median der Stichprobe; $^3Q_1$, unteres Quartil; Q_3, oberes Quartil; ^4n, Stichprobenumfang.

Die verdoppelten DNS-Längen pro Entfernungsklasse der Klassenbreite 6 µm (Σ O.-O.-Längen) wurden durch Multiplikation der jeweiligen Klassenmitten mit den Klassenhäufigkeiten erhalten.

Unterschiede wie die reinen Häufigkeitsverteilungen. Der Medianwert der Speicheldrüsen, 64,1 µm, ist jedoch auch hier geringfügig größer als der der Gehirne, 61,7 µm. Aus den oberen Quartilen (Q_3) aus TABELLE 22 läßt sich ableiten, daß sowohl in Gehirnen als auch in Speicheldrüsen 75% der analysierten DNS von Repliconlängen < 90 µm verdoppelt wurde.

Varianzanalysen zur Topographie der Replicons erbrachten für beide Organe vergleichbare Resultate. In beiden Organen läßt sich für einen großen Prozentsatz der Replicons, 73% der Gehirne und 52% der Speicheldrüsen, die Tendenz nachweisen, daß Replicons ähnlicher Längen in Gruppen zusammenliegen. Die durchschnittliche Länge dieser Gruppen (ARG-Serien) betrug 95 µm für die Gehirne und 113 µm für die Speicheldrüsen.

Gewisse Parallelen lassen sich auch im Initiationsverhalten ($\overline{P_1P_r}$-Längen) beider Organe erkennen. So erfüllten beide Organe die gesetzten Kriterien für die Varianzanalyse nicht. Während jedoch 41% bei den Gehirnen das Kriterium erfüllten, waren es bei den Speicheldrüsen nur 14%. Vergleicht man die TABELLEN 16 (Gehirne) und 19 (Speicheldrüsen), so findet sich der jeweils größte Anteil der $\overline{P_1P_r}$-Längen in der 0 - 50 µm Klasse; 89% aller $\overline{P_1P_r}$-Längen der Gehirne bzw. 78% aller $\overline{P_1P_r}$-Längen der Speicheldrüsen. In der Klasse 50 - 100 µm finden sich 8% bei den Gehirnen, dagegen 16% bei den Speicheldrüsen. Durch die verschiedenen Replikationsraten in Gehirnen und Speicheldrüsen entsprechen die $\overline{P_1P_r}/2$-Entfernungen unterschiedlichen Zeitintervallen. So initiieren in den Gehirnen 89% der Replicons innerhalb 71 Min. und 8% innerhalb 143 Min.; d.h., 97% innerhalb 143 Min. . In den Speicheldrüsen initiieren 78% der Replicons innerhalb 4,2 Stdn. und 16% innerhalb 8,3 Stdn.; d.h. 94% innerhalb 8,3 Stdn..Die längste gemessene $\overline{P_1P_r}$-Strecke der Gehirne betrug 336 µm, die der Speicheldrüsen 247,4 µm. Unter der Annahme eines Origins pro $\overline{P_1P_r}$-Länge, entsprechen die 336 µm der Gehirne 8 Stdn. und die 247,4 µm der Speicheldrüsen 20,6 Stdn. . Es scheint als ob die $\overline{P_1P_r}$-Längen beider Organe ähnliche Häufigkeitsverteilungen besitzen, denen jedoch durch die unterschiedlichen Replikationsraten in beiden Organen unterschiedliche Zeitintervalle entsprechen.

IV. DISKUSSION

Voraussetzung der vorgelegten Befunde war die Möglichkeit, Organe in vitro zu inkubieren. In dem beschriebenen Medium zeigten die Speicheldrüsen im getesteten Zeitraum von 24 Stdn. ^{3}H-dThd-Einbau. Die Cytologie der polytänen Speicheldrüsenkerne war zufriedenstellend. Das gilt auch für die Gehirne.

Die Effektivität des DNS-Syntheseblocks durch FdUrd (5×10^{-7}M) war größer als 80%, wie durch Substitution von dThd durch BrdUrd/^{3}H-dThd in Speicheldrüsen nachgewiesen werden konnte. Die BrdUrd Versuche bestätigen, daß der Einbau (^{3}H-dThd) auf semikonservativer Verdopplung der DNS beruht (vgl.a. SIMON, 1961; CHUN, 1961) und DNS-"repair"-Synthese als Ursache für den massiven ^{3}H-dThd-Einbau ausgeschlossen werden kann (vgl. PETTIJOHN und HANAWALT, 1964). Aus dem im Medium angebotenen molaren Mengenverhältnis von dThd:BrdUrd (1:9) sollte eine theoretische Substitution von 90% dThd durch BrdUrd erwartet werden. Gefunden wurden in den polytänen Speicheldrüsen nur 69% BrdUrd und 16,4% ^{3}H-dThd; 14,6% dThd müssen dem unvollständig blockierten endogenen Pool entstammen. Aus diesem Befund läßt sich ableiten, daß dTTP (im Pool) bzw. ^{3}H-dThd (im Medium) dem Substituenten, BrdUrd, vorgezogen werden. Eine vergleichbare Situation wird für E.coli TAU-bar beschrieben (HACKET und HANAWALT, 1966). Bei gleicher BrdUrd Konzentration (1×10^{-5}M) und einem Thymin : BrdUrd Verhältnis von gleichfalls 1:9 wurden in E.coli TAU-bar 62% substituiert. Die polytänen Speicheldrüsenzellen von D.virilis bevorzugen in vergleichbarem Verhältnis Thymidin gegenüber 5-Brom-2'-desoxyuridin.

Die durch die Inkubation erzielten spezifischen Aktivitäten in den DNS-Molekülen aus D.virilis Gehirnen bzw. Speicheldrüsen, 6×10^{5} dpm/µg bzw. 1×10^{5} dpm/µg, reichten für eine DNS·DNS in situ-Renaturierung aus. Es konnten alle 3 Satelliten der D.virilis Gehirne-DNS in situ im α -Hetero-

chromatin der polytänen Speicheldrüsen lokalisiert werden (z.B. ABB. 15), während der β-heterochromatische Anteil des Chromozentrums im allgemeinen keine Markierung zeigte (für Einzelheiten s. STEINEMANN, 1976). Ein Vergleich der Markierungen der Sammelchromozentren zwischen den vereinzelt in den Präparaten anwesenden, vorwiegend diploiden Anlage-Zellen und dem α-Heterochromatinkörperchen (homolog dem Sammelchromozentrum) der polytänen Speicheldrüsenkerne bestätigen die Ergebnisse von GALL ET AL. (1971). Wie in ABB. 18 deutlich gemacht wird, entsprechen sich die Markierungsumfänge in beiden Strukturen und unterstreichen nochmals die augenscheinliche Beobachtung der Unterreplikation des α-Heterochromatins (s.a. ABB. 6). Dagegen zeigte das β-Heterochromatin des Chromozentrums Markierung, als die ^{3}H-dThd markierte Speicheldrüsen-DNS mit denaturierten polytänen Speicheldrüsenkernen renaturiert wurde (ABB. 19). Da unter den verwendeten Renaturierungsbedingungen nur relativ konzentriert vorkommende repetitive Sequenzen einen signifikanten Markierungsbeitrag leisten können, muß davon ausgegangen werden, daß der mitreplizierte β-heterochromatische Anteil der polytänen Speicheldrüsen, vorwiegend mittelrepetitive Sequenzen enthält (vgl. a. RENKAWITZ, 1978).

Markierungsmuster, S-Phasenlänge und Replicon-längen in diploiden Zellkernen

Wie die Markierungsmuster der Metaphasechromosomen und der Interphasekerne belegen, verdoppelt sich das Chromatin in der Reihenfolge: (1) nur Euchromatin, (2) Eu- und α-Heterochromatin und (3) nur α-Heterochromatin. Eine klare Einstufung des β-Heterochromatins in diesen Replikationsablauf läßt sich aus den angedeuteten cytologischen Schwierigkeiten nicht durchführen. Jedoch kann man aus den Markierungsmustern der polytänen Kerne ableiten, daß das β-Heterochromatin später (oder mit verminderter Anzahl von Initiationsstellen) einsetzt als die Verdopplung des Euchromatins der Riesenchromosomenarme (ABB. 24a, b und ABB. 25a ; HÄGELE, 1973).

Andererseits geht die Markierung in den Interphasekernen mit ausschließlicher Euchromatinmarkierung bis an die Grenze des α-heterochromatischen Sammelchromozentrums (ABB. 20f, f' und b). Vermutlich beginnt also das β-Heterochromatin mit der Replikation vor dem α-Heterochromatin, jedoch nach dem Einsetzen der Verdopplung des Euchromatins.

Da bei D.virilis die Geschlechtschromosomen, insbesondere das X, cytologisch nicht eindeutig identifiziert werden können, läßt sich nur die Vermutung aussprechen, daß das zuerst vollständig durchreplizierte Chromosom das X sein könnte. Die Vermutung gründet sich auf die Tatsache, daß ein einzelnes Chromosom und nicht ein Chromosomenpaar unmarkiert ist, während das vermutliche Y Chromosom derselben Metaphaseplatte noch Markierung zeigt (ABB. 21c).

Das α-Heterochromatin enthält drei dA·dT-reiche Satelliten, I, II und III (GALL ET AL., 1971; STEINEMANN, 1976), die also alle drei im Vergleich zur Hauptbanden-DNS ihre Verdopplung verzögert beginnen. Andererseits, wie unten noch dargelegt wird, benötigen sie mehr Zeit zu ihrer Verdopplung als die Hauptbanden-DNS; d.h., sie sind nicht nur "spät" sondern auch "lang" replizierend. Ob das proximale Heterochromatin in den einzelnen Chromosomenarmen jeweils alle 3 Satelliten enthält und, wenn dies zuträfe, ob sie in vergleichbaren Proportionen in jedem dieser Heterochromatin-Segmente vertreten sind, ist nicht bekannt. Es wäre auch denkbar, daß die drei Satelliten-Species in den einzelnen Chromosomen unterschiedlich verteilt, bzw. in unterschiedlichen Proportionen vorkommen und daß dies zu einer asynchronen Beendigung der Replikation in den Heterochromatin-Segmenten führt.

Es wurde festgestellt, daß der Zellzyklus (22,9 Stdn.) der durch den Kurzpuls erfaßten Zellpopulation in D.virilis Gehirnen sich wie folgt gliedert: G_1: 4,1 Stdn.; S: 11,9 Stdn. und $G_2+1/_2M$: 6,9 Stdn..Die Zellzyklusparameter der im Organ markierten Zellpopulation sind denen in D.melanogaster Zellkulturen bestimmten sehr ähnlich (DOLFINI ET AL., 1970;

ANANIEV ET AL., 1977). Theoretisch sollte der Abfall der "Markierten-Mitose-Kurve" dem umgekehrten Verlauf des Anstiegs entsprechen. Aus dem vorgefundenen abgeflachten Abfall der Kurve muß auf eine gewisse Heterogenität in der S-Phasenlänge innerhalb der erfaßten Zellpopulation geschlossen werden.

Projiziert man die prozentualen Markierungshäufigkeiten der oben dargestellten Markierungsmuster auf die S-Phasenlänge, so lassen sich die relativen Anteile in Zeitwerte übertragen. Zieht man die Markierungshäufigkeiten der Zeilensummen der Musterverteilung der Metaphasechromosomen in TABELLE 10 denen der Interphasekerne vor, so ergibt sich folgende grobe Abschätzung der Zeitintervalle: nur Euchromatin, 1 Std.; Eu- und α-Heterochromatin, 9 Stdn.; nur α-Heterochromatin, 2 Stdn..Andererseits wurde das Zeitintervall zwischen den 50%-Werten des Linienzuges für nur α-Heterochromatin mit 5 Stdn. und für Eu- und α-Heterochromatin mit 10 Stdn. bestimmt. Wie in III.4.1.5. schon dargelegt, muß mindestens einer der Werte überhöht sein, da ihre Summe die S-Phasenlänge überschreitet. Da die Verteilung der nur α-Heterochromatin-Verdopplung in ABB. 23 einen stark abgeflachten Kurvenverlauf zeigt, muß man davon ausgehen, daß das geschätzte 50%-Intervall mit 5 Stdn. zu hoch liegt. Es wurden deshalb für den Zeitraum der alleinigen α-Heterochromatin-Verdopplung 3 Stdn. angesetzt. Bei 1 Std. für nur Euchromatin verbleiben für die gemeinsame Verdopplung von Eu- und α-Heterochromatin 8 Stdn..Die gemeinsame Markierung von Eu- und α-Heterochromatin ist in den diploiden Kernen von D.virilis die längste Markierungsphase. Andererseits finden ANANIEV ET AL. (1977) in Zellkulturen von D.melanogaster nur eine geringfügige Überlappung beider Muster. Die Ursachen dieser Diskrepanz sind unklar. Aufgrund der vorstehenden Schätzungen beträgt die Verdopplungszeit des Euchromatins (S_{Eu}) 9 Stdn. und die des α-Heterochromatins (S_H) 11 Stdn.. Alle proximalen Heterochromatin-Segmente zusammen benötigen also 2 Stdn. länger für ihre Verdopplung als die euchromatischen.

Innerhalb einer Stunde steigert sich die Euchromatin-Markierung von zunächst verstärkter zu beinahe vollständiger Schwärzung, die nur das α-Heterochromatin ausspart. Eine Steigerung der Einbaurate kann entweder auf einer Aktivierung weiterer Origins oder auf einer Zunahme der Replikationsrate (v_{RG}) im Verlauf der S-Phase (PAINTER und SCHAEFER, 1971; HOUSMAN und HUBERMAN, 1975) beruhen. Eine grobe Abschätzung des Effekts einer 2- bis 3fachen Steigerung der v_{RG} ergab, daß dies nicht ausreichen würde, um die lockere Markierung des Euchromatins bis zur Vollmarkierung zu verstärken. Die plausibelste Deutung der Einbausteigerung ist deshalb die einer Zunahme der Wachstumspunkte, ausgehend von zusätzlich initiierten Origins.

Wenn es richtig ist, daß der überwiegende Teil der Euchromatinreplicons innerhalb der Anfangsphase von 1 Std. initiiert, so sollte auch ein entsprechender Anteil der $\overline{P_1P_r}$-Längen in eine Klasse fallen, die diesem Zeitintervall entspricht. Tatsächlich gehören 89% aller $\overline{P_1P_r}$-Längen der Klasse 0 - 50 µm an und 97% liegen unter 100 µm (TABELLE 16). Bidirektionale Replikation vorausgesetzt und bei einer angenommenen v_{RG} von 0,35 µm x Min.$^{-1}$ entsprechen diese Längen Zeitintervallen von 71 Min. bzw. 143 Min.; d.h., 89% bzw. 97% der replizierenden Replicons haben innerhalb dieser Zeitintervalle initiiert. Die Verteilung der $\overline{P_1P_r}$-Werte stützt die Annahme, daß der überwiegende Teil der nicht dem α-Heterochromatin angehörenden Replicons innerhalb eines Zeitintervalls von 1 Std. initiiert. Die Methode der DNS-Fadenautoradiographie unterliegt jedoch der Einschränkung, daß nur replizierende Replicons eindeutig bestimmt werden können. Sollten Bereiche von einer größeren als der durchschnittlichen ARG-Serienlänge (130 µm bzw. 2,5 x 10^8daltons) vorkommen, die keine initiierten Replicons enthalten, so fänden diese in der Analyse keine Berücksichtigung. Wie die Analyse der chromosomalen Markierungsmuster der polytänen Kerne zeigt (s. unten), ist es jedoch äußerst unwahrscheinlich, daß größere Bereiche des Euchromatins erst nach der Phase der kontinuierlichen Markierung ihre DNS-Verdopplung initiieren.

Absolute Zeitintervalle in der Initiationsabfolge der individuellen Replicons lassen sich, wie in III.5.1.5. erläutert, nur aus $\overline{P_1P_r}$-Längen einer ARG-Serie bestimmen. Die längste gemessene $\overline{P_1P_r}$-Länge entsprach 8 Stdn., die kleinste dieser ARG-Serie 47 Min..Dies entspricht einem Zeitintervall in der Initiationsabfolge von ungefähr 7 Stdn.. Wie in der Diskussion der möglichen Fehlerquellen in III.5.1.3. erläutert, liegen die 7 Stdn. vermutlich an der oberen Grenze der Abschätzung (maximal 9 Stdn.).

Die zweite Determinante des chromosomalen DNS-Verdopplungsablaufs im Euchromatin ist die Länge der Replicons. Legen wir die Annahme zugrunde, daß der Großteil der Euchromatin-Replicons innerhalb der ersten Stunde der S-Phase initiiert, so haben die Repliconlängen auf den chromosomalen Verdopplungsablauf folgenden Einfluß. Während die größten Replicons diejenigen Elemente darstellen, die letztlich die Länge von S_{Eu} = 9 Stdn. bestimmen, bzw. die späten Markierungsmuster des Euchromatins hervorrufen (s. unten, polytäne Kerne), sollten - einheitliche v_{RG} vorausgesetzt - jene Elemente, die den größten Anteil an der Verdopplung der DNS ausmachen hauptsächlich für die Verteilung und Dauer der kontinuierlichen Markierung verantwortlich sein. $^3/_4$ der analysierten DNS-Längen der Gehirne wird von Replicons $\leqslant$ 88,6 µm verdoppelt (s. TABELLE 22). Bei v_{RG} von 0,35 µm x Min.$^{-1}$ und bidirektionaler Replikation entspricht dies einem Zeitintervall von 129 Min. (2,1 Stdn.). Diese Replicongruppe sollte mithin den Replicontyp der kontinuierlichen Markierung des Euchromatins stellen. Addiert man die 129 Min. zu der geschätzten oberen Begrenzung des Initiationsintervalls von 71 Min., so sollte das Gros des Euchromatins in $\leqslant$ 200 Min., also maximal 3,3 Stdn. nach S-Phasenbeginn verdoppelt sein.

Die Spannbreite der Repliconlängen reicht von 2 - 238 µm, gemessen von $\overline{P_1P_r}$-Mitte zu $\overline{P_1P_r}$-Mitte (s. III.5.1.3.). Medianwert der Häufigkeitsverteilung der Repliconlängen ist 21,0 µm. Da jedoch ein großer Teil der kleinen Replicons ARG-Serien entstammt, die vermutlich an der Verdopplung des

α-Heterochromatins beteiligt sind (s. III.5.1.4. und III.5.3.2.), ist für die Euchromatinreplicons der Medianwert von 21,0 µm zu klein. Wird der Medianwert um die "en bloc" vorkommenden kleinen Replicons korrigiert, so erhöht er sich auf 31,0 µm.

Die positiv schiefe Verteilung in ABB. 31 unten zeigt einen positiven Auslauf, welcher bei 238 µm endet; 238 µm entsprechen - bei einer v_{RG} von 0,35 µm x Min.$^{-1}$ - 5,7 Stdn.. Die Replicon-klassen des positiven Auslaufs sollten demzufolge die Markierungsmuster der restlichen 6 Stdn. der insgesamt 9stündigen S-Phasenlänge des Euchromatins bestimmen ("weak points" ausgenommen). Die längste überhaupt gemessene Repliconlänge entspricht einer Verdopplungszeit von 8,9 Stdn.. Da in diesem Fall das begrenzende Replicon zweifelhaft ist (ABB. 33b), ist es wohl realistischer, die obere Grenze bei 250 µm anzusetzen; dies entspräche einer Verdopplungszeit von 6 Stdn.. Die "spät"- bzw. "lang"-replizierenden Orte des Euchromatins müssen in der Regel lange Replicons repräsentieren (s.a. Riesenchromosomen). Demzufolge sollten nach Kurzpulsmarkierung die Markierungsmuster mitotischer Chromosomen in den euchromatischen Regionen vor allem gegen Ende der Verdopplungsphase durch diskrete "Spot"-Markierung charakterisiert sein. Diese Muster wurden auch beschrieben, z.B. TAYLOR (1960).

Die α-Heterochromatin Verdopplung

Das α-Heterochromatin beginnt ungefähr 1 Std. nach Beginn der S-Phase mit seiner Verdopplung und beschließt die S-Phase allein. Mit einer Verdopplungszeit von 11 Stdn. benötigt es 2 Stdn. mehr für seine Verdopplung als das Euchromatin, obwohl sein Mengenanteil am Genom in etwa dem des Euchromatins entspricht (s. III.1.). Das α-Heterochromatin wird in den polytänen Speicheldrüsenkernen des verwendeten 3. Larvenstadiums nicht mitverdoppelt. Dies war Hauptursache für die Verwendung von D.virilis. Wenn dem α-Heterochromatin ein abweichendes Replikationsverhalten zugrunde liegt, so

sollte dies im Vergleich der DNS-Fadenautoradiographien von Gehirnen und Speicheldrüsen ersichtlich werden.

Zwei ARG-Anordnungen der diploiden Kerne unterscheiden sich von denen, die in den polytänen Speicheldrüsenkernen vorgefunden wurden. Es fanden sich in den DNS-Fadenautoradiographien der Speicheldrüsen keine DNS-Fäden mit diffuser, bzw. unregelmäßiger Markierung (vgl. ABB. 35d - f). Andererseits fand sich in den Speicheldrüsen unter 42 ARG-Serien nur eine (0,4%) mit vielen kurzen Replicons; in den Gehirnen waren es 9 ARG-Serien (15,3%) aus 59. Da diese Befunde die einzigen gravierenden Unterschiede in den analysierten Repliconformen darstellen, kann vermutet werden, daß folgende Replikationsformen an der Verdopplung des α-Heterochromatins beteiligt sind: einerseits kurze, klar definierte ARGs; andererseits DNS-Fäden, deren ARGs jeweils aus einzelnen, bzw. in kleinen unregelmäßigen Gruppen zusammenliegenden, durch sehr kleine Abstände getrennte, Silberkörnchen bestehen. Das Fehlen klarer Doppelpulsmarkierungen läßt keine Rückschlüsse auf Replikationsrichtung und Replikationsrate zu. Bei einer mit dem Euchromatin vergleichbaren Replikationsrate sollte die Vielzahl dicht benachbarter Replicons zu einer kurzen Gesamtverdopplungszeit führen; wie jedoch ausgeführt, ist sie länger. Diese Befunde sprechen gegen lange Replicons, die eine längere Replikationsdauer erklären könnten (vgl. dazu BLUMENTHAL ET AL., 1974).

Wird die Gesamtheit der Verdopplung durch die drei Größen: zeitliche Initiationsabfolge aller Origins, Repliconlänge und Replikationsrate bestimmt, müssen bei kleinen Repliconlängen zeitliche Initiationsabfolge oder Replikationsrate die limitierenden Größen sein. Da die $\overline{P_l P_r}$-Längen innerhalb der ARG-Serien jedoch klein sind, bestünde nur die Möglichkeit, daß DNS-Fäden, die länger als die durchschnittlichen ARG-Serien (130 µm) sind, als Ganzes verspätet initiieren könnten und somit der Analyse entgingen. Als zweite Möglichkeit wäre eine unterschiedliche Replikationsrate des α-Heterochromatins in Betracht zu ziehen. Dagegen spricht, daß sich nach 5 Min. Pulszeit erste Pulsmarkierungen

(heißer Puls) finden und daß die Origins sehr dicht zusammenliegen, so daß die Replikationsrate sehr viel geringer sein müßte, um die längere Verdopplungszeit des α-Heterochromatins zu erklären. Die erste Möglichkeit, daß nämlich in Abschnitten mit vielen Initiationsstellen relativ einheitlich initiiert wird, während die verschiedenen Abschnitte in ihrer Initiation voneinander unabhängig sind, wird für wahrscheinlicher gehalten. Diesen Abschnitten könnten Überstrukturen in der Chromatinabpackung entsprechen. Die Methode der DNS-Fadenautoradiographie schließt jedoch gerade Informationen über große unmarkierte Bereiche aus.

Das α-Heterochromatin enthält drei engverwandte dA•dT-reiche Satelliten, I, II und III, denen eine sich millionenfach wiederholende Grundeinheit, ein Heptanukleotid, zugrunde liegt. Die Basisheptanukleotide der drei Satellitenfraktionen unterscheiden sich jeweils durch den Austausch eines Basenpaars (GALL und ATHERTON, 1974). Es ist wenig wahrscheinlich, daß allein durch die Sequenzen der "simple sequence"-DNS spät oder lang verdoppelnde Bereiche definiert werden können. Eher könnte das longitudinale DNS-Packungsverhältnis eine Rolle spielen; im α-Heterochromatin beträgt es etwa 4000:1, ist also vergleichbar dem des Euchromatins in den Metaphasechromosomen, d.h., während das Euchromatin sich nach der Mitose entspiralisiert, scheint das α-Heterochromatin diesen Verpackungszustand im Verlauf des gesamten Zellzyklus beizubehalten. Sollte die dichte Verpackung des α-Heterochromatins Ursache des späteren Beginns und der längeren Dauer der Replikation sein? Könnte die Verdopplung des α-Heterochromatins also durch die Auffaltung der DNS durch Verpackungsproteine bestimmt sein und nicht primär durch DNS-Strukturen?

Die Auffaltung der DNS in verschiedenen Packungsstufen ist vor allem eine Funktion der Histone. Die erste Abpackung in Form der Nukleosomen wird durch jeweils 2 Moleküle Histon H2A, H2B, H3 und H4 (KORNBERG, 1974) bewerkstelligt. Histon H1 ist an der weiteren Auffaltung beteiligt (HOZIER ET AL., 1977).

Es gibt Hinweise, daß das α-Heterochromatin von D.virilis eine modifizierte (phosphorilierte) H1-Subpopulation enthält (BLUMENFELD ET AL., 1978). Möglicherweise besteht hier ein Zusammenhang mit dem speziellen Typ von Abpackung, wie er offensichtlich im α-Heterochromatin vorliegt. Andererseits besteht eine Kopplung zwischen DNS-Synthese und Histonsynthese und umgekehrt (WEINTRAUB, 1972b; BORUN, 1975; ELGIN und WEINTRAUB, 1975; PEDERSON, 1976). Sollten modifizierte Histone, insbesondere H1, für den heterochromatischen Charakter verantwortlich sein, so könnten die Modifikationsschritte Ursache eines verzögerten Replikationsbeginns des α-Heterochromatins sein.

Markierungsmuster und Repliconlängen in polytänen Speicheldrüsenkernen

Das Replikationsmuster der Riesenchromosomen wird ausschließlich geprägt von der Verdopplung des Eu- und des β-Heterochromatins. Während sich die Beschreibung von Markierungsmustern in Interphasekernen bzw. Metaphasechromosomen auf die Differenzierung zwischen Eu- und α-Heterochromatinhälften beschränken muß, erlauben die euchromatischen Riesenchromosomenarme eine detaillierte Analyse der Markierungsmuster. Im Vergleich zum Euchromatinabschnitt des Metaphasechromosoms (ungefähr 3 µm) zeigen die Riesenchromosomen eine 50fache Längsstreckung (150 - 170 µm, HEITZ, 1934), bei gleichzeitiger Querschnittszunahme infolge der Endoreduplikationen. Riesenchromosomen bieten ideale Voraussetzungen für Feinanalysen von Verteilung und zeitlichem Ablauf der DNS-Verdopplung (Übersichtsartikel, RUDKIN, 1972).

Es lassen sich, wie in III.4.2. ausgeführt, 3 Muster unterscheiden, wobei eine gewisse Komplementarität zwischen Anfangs- und Endmuster besteht: diskontinuierlich I, kontinuierlich und diskontinuierlich II. Die analysierten Kurzpulsmarkierungen der D.virilis Kontrollautoradiographien, parallel zu den DNS-Fadenautoradiographien angefertigt, haben einen M.I.

von 0,39 ergeben. 14,6% zeigten kontinuierliche Markierung, 14% diskontinuierliche vom Typ I und 71,4% diskontinuierliche Markierung vom Typ II.

Wie für Sciara (GABRUSEWYCZ-GARCIA, 1964), Chironomus (HÄGELE, 1970) und D.melanogaster (HÄGELE, 1973) gezeigt wurde, ist die Anfangsphase der Verdopplung (diskontinuierlich I) gekennzeichnet durch die Markierung von Interbanden, dünnen Querscheiben und Puffs, während dicke Querscheiben und das β-heterochromatische Chromozentrum noch unmarkiert sind. Bei D.melanogaster waren einzelne dicke Querscheiben auch in der Anfangsphase markiert (HÄGELE, 1973). Im kontinuierlichen Markierungsmuster sind alle Bereiche des polytänen Chromosomenkomplements markiert. Das diskontinuierlich II Markierungsmuster ist gekennzeichnet durch die sukzessive Abnahme markierter Abschnitte bis auf wenige, stets die gleichen Chromosomenabschnitte. Diese "fleckige" Markierung bestimmt durch ihre Häufigkeit vor allem das Markierungsbild der polytänen Speicheldrüsenkerne.

ARCOS-TERÁN (1972) findet, daß 70% der Markierung des polytänen X Chromosoms bei D.melanogaster dem hier mit diskontinuierlich II benannten Markierungstyp angehört und 30% nur dem kontinuierlichen Typ. Ferner wird darauf hingewiesen, daß über 90% aller Querscheiben des X Chromosoms ihre Replikation in weniger als einem Drittel und ein großer Teil schon innerhalb eines Fünftels der Gesamtdauer des Replikationszyklus beenden.

Nach eigenen, vorläufigen Befunden beginnt auch bei D.virilis die Verdopplung des polytänen Genoms in den Interbanden und feinen Banden bzw. in Puffs. Das β-Heterochromatin "hinkt" hinterher. Dies wurde auch für den spät replizierenden Abschnitt 3C im X Chromosom von D.melanogaster gezeigt (HÄGELE, 1973). Wie aus der Häufigkeit der Muster zu schließen ist, scheint diese Anfangsphase kurz zu sein, 2,4% in D.melanogaster (HÄGELE, 1973), ungefähr 11% in C.th.thummi[1] (HÄGELE, 1970) und 14% in D.virilis bezogen auf das Chromozentrum,

---

[1] 74 von 688 markierten polytänen Kernen von C.th.thummi zeigten nur die Kinetorchorregionen ohne Markierung; dies entspricht 11%.

s. oben). An die kontinuierliche Markierung schließt diskontinuierlich II an. Extrapoliert man die Befunde von ARCOS-TERÁN (1972), gemacht am X Chromosom von D.melanogaster, auf das Gesamtgenom, so lassen sich folgende Thesen aufstellen: (i) Ungefähr 90% der Banden beenden kurz nach dem kontinuierlichen Muster die Verdopplung. Korreliert man Musterhäufigkeit mit Zeitanteil (s. auch diploide Kerne) so erfolgt dies in weniger als $^{1}/3$ der Verdopplungszeit des gesamten polytänen Genoms. (ii) $^{2}/3$ der Verdopplungszeit beanspruchen wenige, eng begrenzte Chromosomenabschnitte. (iii) Markierte Zonen des frühen diskontinuierlich II Musters umfassen noch mehrere Banden (vgl. ABB. 10c), d.h., die benachbarten Replikationsabschnitte dieser Zonen scheinen ein ähnliches Replikationsintervall zu benötigen.

Die spät replizierenden Banden (diskontinuierlich II) lassen sich in zwei Klassen einteilen: (i) Die letzten markierten Orte des X Chromosoms, Anzahl 1 - 5 (Muster V bei ARCOS-TERÁN, 1972) sind alle "weak points", Chromosomenabschnitte also, welche eigentümliche Verengungen in der Chromosomenkontinuität zeigen (BRIDGES, 1935). Dieselben Orte sind gleichfalls charakterisiert durch die Eigenschaft des "ectopic pairing" (SLIZYNSKI, 1945). Mit "ectopic pairing" wird die Tendenz dieser Orte bezeichnet, mit anderen gleichartigen Stellen oder mit dem Kinetochoren- und Telomerenheterochromatin zu verkleben. (ii) Die zweite Gruppe der spät replizierenden Orte, welche jedoch vor der in (i) beschriebenen ihre Verdopplung beendet, umfaßt relativ dicke Banden oder Bridgessche Doppelbanden (doublets). Allerdings läßt sich letzteres nicht generalisieren, denn nicht alle Doppelbanden zeigten dieses Verhalten; jedoch gab es keine feinen Banden oder Bandengruppen, die spät replizieren. Wenige Fälle, in denen schwach Feulgen-positive Strukturen ungewöhnlich lange markiert bleiben, werden jedoch von HÄGELE (1970) für Chironomiden beschrieben.

Nach RUDKIN (1972) enthält das haploide Genom von D.melanogaster 0,18 pg DNS, wovon 78% (0,14 pg) in den Riesenchromosomen enthalten ist (RUDKIN, 1965, 1969). Bei einer Gesamtzahl von etwa

5059 Banden (BRIDGES zitiert in RUDKIN, 1972), erhält man für eine durchschnittliche Bande den Wert von 17 x 10^6 daltons DNS pro Chromatide. Dies entspricht einer DNS-Fadenlänge von etwa 9 µm. Außerdem wurden von RUDKIN (1961) 60 Banden in D.melanogaster individuell ausgemessen, deren Polytäniegrad bestimmt werden konnte. Die DNS-Werte pro Bande und Chromatide reichen von 3 x 10^6 bis zu 365 x 10^6 daltons, mit einem Mittelwert von 21 x 10^6 daltons; dies entspricht DNS-Fadenlängen in den Chromomeren von 2 - 190 µm und einem Mittelwert von 11 µm. Wenn man die D.melanogaster Befunde auf D.virilis überträgt und für D.virilis eine diploide Gesamt-Genomlänge von 24,6 cm ansetzt, davon den Satellitenanteil (45%) von 11,1 cm abzieht, so ergibt sich ein euchromatischer Längenanteil von 13,5 cm, bzw. haploid von 6,8 cm. Bei 5000 Banden entspricht dies einer durchschnittlichen Länge von 13,6 µm pro Chromomer und Chromatide. Dies stellt eine minimale Abschätzung dar. Bei 2000 Banden erhält man als Schätzwert 34 µm.

Es fanden sich in allen analysierten ARG-Serien von D.virilis Speicheldrüsen keine Hinweise, welche der Annahme widersprachen, die diskontinuierliche Gliederung in Banden-Interbanden werde nicht von kontinuierlich, linearen DNS-Fäden durchzogen. Die längsten ausgewerteten ARG-Serien zeigten Längen von 456 µm, 625 µm und 720 µm (vgl. ABB. 44); die durchschnittliche Länge der ARG-Serien lag bei 166 µm. Alle analysierten ARGs mit Doppelpulsmarkierung ließen sich unter der Annahme bidirektionaler Replikation widerspruchfrei interpretieren. Unidirektional interpretierbare ARG-Formen, wie sie in den DNS-Fadenautoradiographien der Gehirne (vgl. ABB. 26b, c) gelegentlich gefunden wurden, kamen in den Speicheldrüsen nicht vor.

Die Spannbreite der Repliconlängen (5 - 203 µm) ist in erstaunlicher Übereinstimmung mit der der DNS-Längen der Chromomeren (RUDKIN, 1972). Wie aus dem Häufigkeitshistogramm (ABB. 43 oben) ersichtlich, fällt die Verteilung ungefähr bei 90 µm stark ab und besitzt einen exzessiven positiven Auslauf; die Verteilung ist positiv schief. Der Medianwert dieser Verteilung

beträgt 39,5 µm, der Mittelwert 46,7 µm. Mittel- und Medianwert der Repliconlängenverteilung liegen erheblich über den Durchschnittswerten der Chromomeren von 9 µm bzw. 11 µm für D.melanogaster, bzw. den grob geschätzten 13,6 µm bei D.virilis. Selbst wenn man die Bandenanzahl bei 2000 ansetzt, so daß sich für D.virilis für das Durchschnitts-Chromomer 34 µm ergeben würde, so läge auch dieser Wert immer noch unter den Repliconwerten. Geht man nun davon aus, daß die ermittelten Repliconlängen einer repräsentativen Auswahl der Gesamtpopulation entsprechen und keine, auch unbewußte Selektion zugunsten größerer Repliconlängen erfolgte, so ergibt sich folgende Situation. Einerseits entsprechen sich die Grenzwerte der Spannbreite beider Verteilungen ganz gut. Aus der Übereinstimmung der Werte am oberen Ende der Spannbreite läßt sich folgern, daß großen Banden äquivalent große Repliconlängen gegenüberstehen, d.h., große Banden können einem großen Replicon (bis 200 µm) entsprechen. Nimmt man den unteren Bereich der Spannbreite bis 20 µm, so entfallen auf ihn 42 der 170 ausgemessenen O.-O.-Längen. Dies entspricht 25% aller ausgemessenen Repliconlängen. Aus dem unteren Bereich der Repliconlängen-Verteilung können demzufolge $^{1}/_{4}$ aller Repliconlängen jeweils einer Bande entsprechen. Da der absolute Häufigkeitsanteil an großen Replicons gering ist, bedeutet dies für ungefähr $^{3}/_{4}$ der Replicons, die dem zentralen Teil der Verteilung entstammen, daß ein Replicon jeweils mehrere Banden verdoppelt. Die in dieser Arbeit vorgelegten Befunde sprechen gegen eine generelle eine-Bande- ein-Replicon-Beziehung. Sie findet jedoch Entsprechungen in den kurzen und vor allem bei den großen Repliconlängen. Große Repliconlängen sollten vor allem das diskontinuierlich II Muster bestimmen, das über $^{2}/_{3}$ der Markierungsmuster umfaßt.

Die oben dargestellte Musterfolge in den polytänen Kernen macht es sehr wahrscheinlich, daß in der Phase der kontinuierlichen Markierung alle aktivierbaren Origins entlang der Chromatiden aktiv sind. Für eine relative Synchronität der lateral assoziierten Replikationsabschnitte der Riesenchromosomen sprechen Markierungsmuster ungepaarter Abschnitte

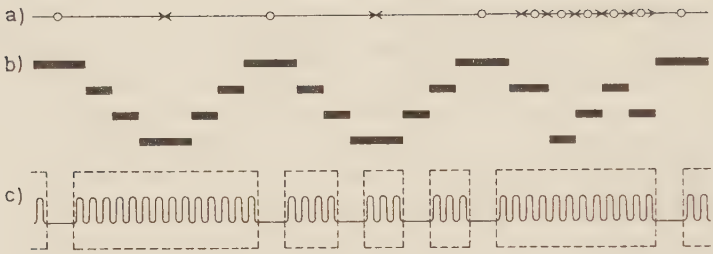


ABB.46

Legende zu ABB. 46:

Modell zum Verdopplungsablauf für den gebandeten Teil der Riesenchromosomen. (a) Interpretation des Verdopplungsablaufs bezogen auf die in Replicons gegliederte Chromatide. O, Origin; →← , Termini, T bzw. T^* (vgl. ABB. 32). (b) Sukzessive Momentaufnahmen replizierender Replicons eines Chromatidenabschnitts. Es wurde eine konstante Replikationsrate angenommen. c) Abschnitt eines Riesenchromosoms - 5 Banden plus Interbanden; eingezeichnet nur eine Chromatide. Von links: große Bande; 3 kleinere Banden; "weak point". Für die große Bande wurde pro Einzelchromatide ein Replicon zugrunde gelegt. Alle drei kleinen Banden werden pro Einzelchromatide von nur einem Replicon verdoppelt. Mehrere replizierende Abschnitte, die zueinander einen unkoordinierten Initiationsablauf zeigen, wurden für den "weak point" angenommen. Innerhalb der Abschnitte soll die Initiation synchron erfolgen; dargestellt wurden die Abschnitte. Die aktiven Origins wurden außer für den "weak point" in den Interbanden angenommen. Jedoch nicht jede der Interbanden besitzt einen Origin.

homologer Chromosomen (diskutiert in PLAUT ET AL., 1966). Wie für die diploiden Kerne dargelegt, sollte auch bei den Speicheldrüsen das kontinuierliche Markierungsmuster, das den Hauptverdopplungsabschnitt widerspiegelt, vor allem durch jene Replicongruppen bestimmt werden, die die größten DNS-Mengen verdoppeln (ABB. 43 unten). Der Medianwert dieser Verteilung beträgt 64,1 µm, und $^3/4$ der analysierten DNS wird von Repliconlängen $\leq$ 80,9 µm verdoppelt (Q_3, oberes Quartil, TABELLE 22). Vor allem Replicongruppen $< Q_3$ sollten das kontinuierliche Markierungsmuster bestimmen. Voraussetzung dieser Behauptung ist ein relativ begrenztes Initiationsintervall des größten Teils der Replikationsorigins. 78% aller ausgemessenen $\overline{P_1P_r}$-Längen liegen in der Klasse 0 - 50 µm, 16% gehören der Klasse 50 - 100 µm an (s. TABELLE 20); d.h., 94% aller $\overline{P_1P_r}$-Längen liegen unter 100 µm. Aus den Befunden, daß einerseits im kontinuierlichen Markierungsmuster der Großteil aller Replicons beteiligt ist und andererseits ungefähr 80% aller Replicons ein Initiationsintervall von $\overline{P_1P_r}$-Längen unter 50 µm aufweisen, muß gefolgert werden, daß die gemessenen Initiationsintervalle der "diskontinuierlich I" und "kontinuierlich" Markierungsphase angehören.

Verknüpft man die obigen Befunde mit der Replikationsrate in den Wachstumspunkten der polytänen Speicheldrüsenkerne, 0,1 µm x $Min.^{-1}$, so läßt sich der zeitliche Ablauf der Riesenchromosomenverdopplung folgendermaßen rekonstruieren. Ungefähr 80% der Origins initiieren innerhalb der $\overline{P_1P_r}$-Klasse von 0 - 50 µm. Dies entspricht einem Zeitintervall von 4,2 Stdn.. Für die Verdopplung von $^3/4$ der analysierten DNS-Längen ($\leq$ 80,9 µm) werden 6,7 Stdn. benötigt. Es wurde jeweils bidirektionale Replikation zugrunde gelegt. Aus der Addition beider Zeitwerte ergibt sich für das maximale Zeitintervall der "diskontinuierlich I" und "kontinuierlich" Markierungsphase 10,9 Stdn.. Berücksichtigt man nun, daß der Musteranteil von "diskontinuierlich I" und "kontinuierlich" an der Gesamtheit der markierten Kerne nur $^1/3$ beträgt, so entfallen auf das "diskontinuierlich II" Muster ($^2/3$) 21,8 Stdn.. 33 Stdn. (25°C) wäre demzufolge die geschätzte S-Phasenlänge

der polytänen Speicheldrüsenkerne von D.virilis. Das 3. Larvenstadium von D.melanogaster dauert bei 25°C etwa 48 Stdn. (BODENSTEIN, 1950). Nach RUDKIN (1972) finden in diesem Zeitabschnitt ein oder zwei Verdopplungszyklen statt. Geht man davon aus, daß das 3. Larvenstadium bei D.virilis von ähnlicher Dauer ist und legt einen Verdopplungsschritt zugrunde, so erscheint eine S-Phasenlänge von 33 Stdn. nicht unrealistisch. Das längste ausgemessene Replicon von 203 µm benötigt für seine Verdopplung 16,9 Stdn., d.h., auch die längste gemessene Repliconlänge könnte innerhalb dieser S-Phasenlänge repliziert werden. Ferner, multipliziert man den Schätzwert von S_{Fu} = 9 Stdn. (diploide Zellen) mit 3,5 als dem Faktor der Replikationsverlangsamung in Speicheldrüsen, so erhält man für die polytänen Zellen eine S-Phasenlänge von 31,5 Stdn..

Wie die Varianzanalyse für die Polytänen Speicheldrüsen- und diploiden Gehirnereplicons für einen Großteil (52% und 73%) der gemessenen Längen signifikant aufzeigt, besteht eine Tendenz von Replicons ähnlicher Längen in Gruppen vorzukommen. Als Gruppenverbände wurden die jeweils vorgefundenen ARG-Serien betrachtet; die durchschnittliche Länge der auf Varianz getesteten Speicheldrüsen ARG-Serien betrug 113 µm, die der Gehirne 95 µm. Diese Tendenz sollte sich in den chromosomalen Markierungsmustern dadurch widerspiegeln, daß ganze Chromosomenabschnitte, bzw. Bandengruppen, noch markiert sind, während benachbarte Abschnitte keine Markierung zeigen. Mustert man daraufhin Autoradiographien polytäner Kerne durch, so läßt sich dies auch demonstrieren (s.z.B. ABBn. 10c und 24d).

Das Markierungsverhalten des β -Heterochromatins und der "weak points" nimmt eine Sonderstellung im Replikationsablauf ein und läßt sich aus den Repliconlängen und ihrer topographischen Anordnung wohl nicht ausschließlich interpretieren, wie es sich auch bei der Verdopplung des α -Heterochromatins gezeigt hat. Ein verzögerter Markierungsbeginn der heterochromatischen Abschnitte polytäner Chromosomen wurde beschrieben für Sciara coprophila (GABRUSEWYCZ-GARCIA, 1964), verschiedene

Chironomus Arten (HÄGELE, 1970), D.melanogaster (HÄGELE, 1973) und D.virilis (III.4.2.). Da es sich gleichzeitig auch um die lang- bzw. spätreplizierenden Orte handelt, liegt den meisten klaren Fällen von komplementärer Markierung das Markierungsverhalten dieser Strukturen zugrunde. So konnte HÄGELE (1970) z.B. ein eindeutiges komplementäres Markierungsmuster für den Heterochromatinblock der Kinetochorregion in Chironomus melanotus demonstrieren, der später mit der Replikation beginnt und sie als letzter beschließt. Interessant ist in diesem Zusammenhang der Befund, daß das Genom von C.melanotus Satellitensequenzen enthält, welche in den polytänen Speicheldrüsenkernen gleichfalls mit verdoppelt werden. Vermutlich sind beide Satellitenfraktionen im Heterochromatin zu lokalisieren (STEINEMANN, 1978). Wie in dieser Arbeit gezeigt, ist das β-Heterochromatin des polytänen Chromozentrums von D.virilis angereichert mit repetiven Sequenzen, die nicht mit den Satelliten I, II und III identisch sind. Analog der α-Heterochromatinsituation in den diploiden D.virilis Kernen wird vermutet, daß auch die Verdopplung der heterochromatischen Abschnitte der polytänen Chromosomen dem dort diskutierten Prinzip folgt (s.a. ABB. 46).

In den DNS-Fadenautoradiographien der Speicheldrüsen wurden keine ARG-Serien gefunden, die eine diffuse, bzw. unregelmäßige Markierung zeigten. Es fand sich jedoch eine ARG-Serie mit 6 ARGs aus 42 ARG-Serien, welche alle O.-O.-Längen unter 20 µm aufwiesen. Dies könnte den Replicontyp darstellen, welcher den "spät" replizierenden heterochromatischen Orten der Riesenchromosomen zugrunde liegt. Natürlich bedarf diese Vermutung weiterer Bestätigung durch zusätzliche Befunde.

Verschiedene Replikationsraten in Gehirn- und Speicheldrüsenzellen

Aus der Gegenüberstellung der Befunde der DNS-Fadenautoradiographien von diploiden Zellen der Gehirne und den polytänen Speicheldrüsenzellen, zeigt sich für die nichthetero-

chromatischen Bereiche eine näherungsweise Übereinstimmung sowohl in der Repliconlängen- als auch in der $\overline{P_1P_r}$- Längenverteilung. Ein auffälliger Unterschied zwischen beiden Organen ist jedoch die Replikationsrate der Wachstumspunkte; die Replikationsrate der Speicheldrüsen (0,1 µm x Min.$^{-1}$) ist 3,5fach langsamer als die der Gehirne (0,35 µm x Min.$^{-1}$). Ursache der Verlangsamung der Replikationsgabeln ist nicht geklärt. Aus den chromosomalen Markierungsmustern läßt sich jedoch ableiten, daß es sich nicht um einen Unterschuß von direkt am Replikationskomplex beteiligten Proteinen handeln kann. Die relativ gute Synchronie der zahlreichen, parallel angeordneten Replicons (PLAUT ET AL., 1966) gleicher Größe würde sonst unverständlich. Als geschwindigkeitslimitierende Elemente wären Umfang der Desoxynucleosidtriphosphat-Pools, bzw. die Histonsyntheseraten denkbar. Daß eine verlangsamte Replikationsrate möglicherweise eine Konsequenz der Polytänie ist, läßt sich aus der Beobachtung ableiten, daß die cytophotometrisch gemessenen Verdopplungsintervalle der Kern-DNS mit zunehmendem Polytäniegrad länger werden (RUDKIN, 1972).

Repliconlänge und Replikationsrate verschieden ausdifferenzierter Zellkerne von Drosophila

Die oben dargelegten Befunde zu den Replikationsparametern - Repliconlänge und Replikationsrate - in D.virilis Gehirn- und Speicheldrüsenzellen sind nicht kongruent mit Ergebnissen aus Versuchen mit Praeblastoderm-Kernen von D.melanogaster und D.virilis. Auf einige Besonderheiten der Kerne vor der Blastodermbildung soll vorweg hingewiesen werden.

Bis zum Beginn der Blastodermausbildung, nach der 13. Teilung, teilen sich die Zellkerne des befruchteten Eis synchron und bilden ein Synzytium (ZALOKAR und ERK, 1976); von einer mitotischen Phase zur nächsten benötigen die Kerne von D.melanogaster 9,6 Min. (24°C); davon nimmt die Interphase 3,4 Min. in Anspruch (RABINOWITZ, 1941a). Das Chromatin der

sich im Synzytium befindenden Kerne ist während der Interphase im Kernplasma gleichmäßig verteilt, und es sind weder Chromozentren, kondensiertes Chromatin, noch ein Nucleolus deutlich sichtbar (SCHULTZ ET AL., 1967, zitiert in MAHOWALD, 1968). Der DNS-Gehalt pro Kern, gemessen für D.melanogaster, entspricht dem der larvalen Neuroblasten. Jedoch deuten Färbungen mit alkalischem Fast Green und saurem Bromphenolblau an, daß einerseits bis zur Blastodermausbildung ein Proteintyp fehlt und andererseits ein basisches Protein, das sogenannte Teilungshiston, anwesend ist. Interessant ist in diesem Zusammenhang der relativ hohe Spermidinanteil in Praeblastodermkernen. Dieser fällt zum Blastodermstadium stark ab. Er würde ausreichen, um 95% der Phosphatgruppen der Nucleinsäuren zu neutralisieren (DION und HERBST, 1970). Auch in anderen schnell wachsenden Systemen, wie in verschiedenen Mikroorganismen, regenerierende Rattenleber oder Hühnerembryonen, wurden die Polyamine als wichtige Polykationen in Verbindung mit der Biosynthese der Nucleinsäuren in Zusammenhang gebracht (zitiert in DION und HERBST, 1970). Bei dem fehlenden Protein soll es sich dagegen um ein Histon, das somatische, adulte Histon von D.melanogaster, handeln (KAUFMANN ET AL., 1962).

Für D.melanogster Praeblastodermkerne beschreiben BLUMENTHAL ET AL. (1974) eine mittlere Origin-Origin-Entfernung von 7,9 kb (2,7 μm[1]); die Dichtemittel der Augen-Augen-Entfernungen der Plateauregion lassen sich als Vielfache von 3,4 kb (1,2 μm) interpretieren. Für die Wachstumspunkte wurde eine Replikationsrate von 2,6 kb x $Min.^{-1}$ (0,9 μm x $Min.^{-1}$) bestimmt. Die größte gemessene Augen-Augen-Länge war 19,5 kb (6,6 μm). Zu ähnlichen Ergebnissen gelangte ZAKIAN (1976) in Praeblastodermkernen von D.virilis. Die Spannbreite der Augen-Augen-Entfernungen der Hauptbanden-DNS (in CsCl Gradienten) reichte von 0,24 kb (0,08 μm) - 73,56 kb (25 μm); der Mittelwert lag bei 5,25 kb (1,9 μm) und die Dichtemittel der Augen-Augen-Längen lassen sich gleichfalls

---

[1] kb Werte wurden durch Multiplikation mit 3,4 Å in μm umgerechnet.

als Vielfache von 4,0 kb (1,4 µm) interpretieren. Analog zu D.melanogaster beträgt die mittlere Origin-Origin-Entfernung in der Plateauregion 8,1 kb (2,8 µm). Die Satelliten enthaltenden Fraktionen zeigen eine größere mittlere Augen-Augen-Entfernung, 18,7 kb (6,4 µm), bei 16 ausgemessenen Strukturen. Außerdem wurde eine erhöhte Anzahl von Ringen in der Satelliten-DNS gegenüber der Hauptbanden-DNS gefunden. Der Verdopplungszyklus der Kerne wurde mit 20 Min. abgeschätzt.

Zweierlei ist beim Vergleich dieser Ergebnisse mit an Gehirnzellen, bzw. Speicheldrüsenzellen erhobenen Befunden zu berücksichtigen: (i) Die Ergebnisse mit den Praeblastodermkernen wurden mit einer anderen Methode erhalten: Spreitung von gereinigter DNS und Analyse der Replikationsstrukturen im Elektronenmikroskop. (ii) Die replizierenden Kerne befinden sich in verschiedenen biologischen Milieus (unterschiedliche Entwicklungsstufen der Ontogenese). Die Vorbereitung der DNS für die EM-Analyse führt im allgemeinen dazu, daß die durchschnittlichen Molekülläng kleiner sind als sie in den DNS-Fadenautoradiographien erhalten werden können: 90 kb (30,6 µm) bei KRIEGSTEIN und HOGNESS (1973), bzw. 60,6 kb (21 µm) bei ZAKIAN (1976) und 166 µm mittlere ARG-Serienlänge für die Speicheldrüsen, bzw. 139 µm für Gehirne (nur interne ARGs der Serien gemessen). Die längsten ausgemessenen ARG-Serien umfaßten 964 µm und 990 µm (ABB. 33a, b). Mit der EM-Methode sind deshalb kürzere Abstände in der Auswertung begünstigt. Legt man die für D.melanogaster bestimmte Replikationsrate von 0,9 µm x Min.$^{-1}$ zugrunde, so folgt aus der Interphasenlänge von 3,4 Min. eine maximale Länge der Replikationsabschnitte von 0,9 µm x Min.$^{-1}$ x 3,4 Min. = 3,1 µm, bzw. eine Origin-Origin-Entfernung von 6,2 µm (bidirektionale Replikation vorausgesetzt). Demzufolge sind die zu erwartenden Replicon-längen relativ klein, und die Tatsache, daß diese Methode für kürzere Moleküllängen geeigneter ist, sollte für die Datenerfassung eine untergeordnete Rolle spielen.

Die mittleren Origin-Origin-Längen von D.virilis Gehirnzellen und Speicheldrüsenzellen, 35,6 µm und 46,7 µm sind etwa

13 - 17fach größer als die der Praeblastodermkerne. Übernimmt man die Replikationsrate von D.melanogaster, so ist die Replikationsrate der Wachstumspunkte in D.virilis Gehirnen 2,5fach, in den Speicheldrüsen sogar 9fach geringer als die 0,9 µm x Min.$^{-1}$ der Praeblastodermkerne. Vergleicht man die S-Phasenlänge der D.virilis Gehirnzellen, 714 Min., mit der Länge des Verdopplungszyklus der D.virilis Praeblastodermkerne, 20 Min. (ZAKIAN, 1976), so ergibt sich eine 36fache Verlängerung. Andererseits, kombiniert man den Origin-Origin-Vergrößerungsfaktor der Gehirne (13fach) mit dem Verzögerungsfaktor der Replikationsrate (2,5fach) so ist der kombinierte Faktor, 33fach, in erstaunlich guter Übereinstimmung mit dem Quotienten der S-Phasenlängen (36fach).

Die chromosomale Verdopplung in drei unterschiedlich ausdifferenzierten Karyotypen von D.virilis stellt sich nun wie folgt dar: Während die Replicongrößen der euchromatischen Abschnitte der diploiden Gehirnkerne sich von denen der Speicheldrüsenkerne nicht signifikant unterscheiden, muß davon ausgegangen werden, daß in den diploiden Praeblastodermkernen 13 - 17mal mehr Origins aktiv sind. In allen 3 Karyotypen ist die Replikationsrate verschieden. Sie ist in den diploiden Praeblastodermkernen am größten (0,9 µm x Min.$^{-1}$) und am kleinsten in den polytänen Speicheldrüsenkernen (0,1 µm x Min.$^{-1}$). Folglich kann der zeitliche Verlauf der Chromosomenverdopplung prinzipiell sowohl über die Replikationsrate als auch über die aktivierbaren Origin-Origin-Entfernungen gesteuert werden. Dies ist im Widerspruch zu den von BLUMENTHAL ET AL. (1974) dargelegten Vorstellungen, findet jedoch Unterstützung in den Ergebnissen von ANANIEV ET AL. (1977).

Wie oben ausgeführt, gibt es histochemische Hinweise dafür, daß sich das Chromatin der Praeblastodermkerne in einigen Komponenten von dem der Blastodermzellen, bzw. der adulten somatischen Zellen, unterscheidet. Ein Wechsel im Vorkommen zwischen einem "Teilungshiston" und einem "somatisch, adulten Histon" wird beschrieben (KAUFMANN ET AL., 1962). Legt man die Origin-Origin-Entfernungen von ZAKIAN (1976) zugrunde, einmal die Origin-Origin-Entfernungen von 2,8 µm, bzw. die 1,4 µm der Basisentfernung der multiplen

Dichtemittelwerte, so sollten in den Praeblastodermkernen in den euchromatischen Abschnitten pro haploidem D.virilis Genom[1] ungefähr 25 000 - 50 000 aktivierbare Origins zur Verfügung stehen. Dieser Vielzahl stehen in den polytänen Speicheldrüsen pro haploidem Genom und einer mittleren Origin-Origin-Entfernung von 46,7 µm ungefähr 1 500 aktive Origins entgegen.

A priori lassen sich zwei Interpretationsalternativen zu diesen Befunden formulieren: (i) In den Praeblastodermkernen haben nicht nur die eigentlichen Initiationssequenzen [2], wenn man solche voraussetzt, initiiert, sondern parallel dazu auch viele unspezifische Abschnitte. Diese Abschnitte könnten durch verwandte Eigenschaften mit den eigentlichen Origin-Sequenzen charakterisiert sein. Eine unspezifische Initiation wird durch die veränderte Chromatinstruktur ab dem Blastodermstadium verhindert. (ii) Geben die 25 000 - 50 000 die potentiell aktivierbaren, tatsächlichen Origin-Sequenzen wieder, so muß, sowohl in den diploiden Gehirnkernen wie auch in den polytänen Speicheldrüsenkernen eine ähnlich große Anzahl aktivierbarer Origins inaktiviert werden. Bei den Speicheldrüsen etwa 16 von 17 möglichen, d.h., einer von 17 bleibt ein funktionsfähiger Origin. Strukturelle Veränderungen des Chromatins nach dem Übergang vom Praeblastoderm zum Blastoderm und den daran anschließenden Entwicklungsstadien könnten Ursache dieser Inaktivierung sein (vgl.a. CALLAN, 1972). Sowohl die Alternative (i) als auch (ii) erlaubt jedoch die Überführung

---

[1] Bei 24,6 cm an diploider Genomlänge und 45% Satellitenanteil (s. STEINEMANN, 1976) entspricht der nicht satellitenenthaltende haploide Genomanteil $6{,}8 \times 10^4$ µm.

[2] Initiationsortenkönnten, analog den Vorstellungen in Prokaryoten, "inverted repeat" Sequenzabfolgen zugrunde liegen, die sich zu "hairpins" oder "cloverleaf" Strukturen anordnen lassen (GROSSSCHEDEL und HOBOM, 1979). "Inverted repeats" wurden auch im Drosophila-Genom nachgewiesen (SCHMID ET AL., 1975).

einer schnellen Verdopplungsphase (Praeblastoderm) in eine langsamere (Blastoderm).

In den Riesenchromosomen sind 95% der DNS in Banden verpackt, nur 5% enthalten die Interbanden. Für die durchschnittliche Bande entfallen 10 µm pro Chromatide; die durchschnittliche Interbande enthält ≤ 0,5 µm pro Chromatide (BEERMANN, 1972). Unter der einfachen Annahme, daß die Origins in gleicher Dichte entlang dem DNS-Fadenmolekül, welches jeweils eine Chromatide durchzieht, angeordnet sind, folgt, daß die Anzahl der Origins proportional der DNS-Menge ist und somit sollten auch die Originverteilungen den DNS-Mengenverteilungen folgen; d.h., die prozentuale Verteilung der Origins sollte gleichfalls 95% in den Banden und 5% in den Interbanden betragen. Die DNS-Länge pro Interbande umfaßt jedoch maximal 0,5 µm, also etwa $^{1}/_{6}$ der Repliconlänge in Praeblastodermzellen (2,8 µm). Bei zufälliger Auswahl der Interbanden-DNS würde dies bedeuten, daß die Wahrscheinlichkeit einen Origin in einer Interbande vorzufinden $^{1}/_{6}$ betragen würde. Legt man 10 µm DNS-Länge pro Bande und Chromatide zugrunde, würde dies einer wahrscheinlichen Repliconlänge von etwa 60 µm entsprechen, wenn nur die in den Interbanden liegenden Origins initiieren könnten.

Nun ist der Beginn der DNS-Verdopplung in den Riesenchromosomen (Markierungsmuster diskontinuierlich I) charakterisiert durch die Markierung von Interbanden, dünnen Banden und Puffs. Treffen die oben gemachten einfachen Annahmen zu, so sollte nicht jede Interbande einen Origin besitzen. Sollte die Gliederung in "Banden"- und "Interbanden"-DNS nicht zufälliger Natur sein, sondern nach einem bestimmten Selektionsprinzip erfolgen, so könnte die Wahrscheinlichkeit, einen Origin in einer Interbande vorzufinden, zunehmen. Dies wäre auch der Fall, wenn die "Basisreplikationseinheit" mit 1,4 µm angenommen würde. Es ist jedoch noch völlig unklar, nach welchen Regeln die Chromomeren-Interchromomeren Abfaltung erfolgt. Aus dem DNS-Packungsverhältnis von 5:1, wie auch aus Immunofluoreszenz-Studien (JAMRICH ET AL., 1977) läßt sich ableiten, daß das Histon H1 in den Interbandenregionen fehlt. Die Initiierbarkeit eines Origins könnte somit direkt,

bzw. indirekt, auf die An-, bzw. Abwesenheit von H1 zurückzuführen sein. Konsequenterweise sollte das Chromatin der Praeblastodermkerne nicht in Chromomeren und Interchromomeren gegliedert sein. Weiterhin sollte die Gliederung in Chromomeren- und Interchromomerenabschnitte abhängig sein von dem erst im Verlauf der Blastodermausbildung nachweisbaren "Histon" (H1?).

Zwischen den gemessenen Repliconlängen in Gehirnen und Speicheldrüsen und den DNS-Längen pro Chromomer lassen sich keine proportionalen Beziehungen ableiten. Aus den Ergebnissen von RUDKIN (1972), mit einer mittleren DNS-Länge von 9 bzw. 11 µm pro Chromomer bei D.melanogaster und den 13,6 µm bzw. 34 µm für D.virilis folgt, daß einem Replicon mehrere mittlere Chromomeren entsprechen müssen. Für die D.virilis Werte würden 1,4 - 3,4 mittlere Chromomeren einem Replicon entsprechen (ABB. 46). Nicht jede Interbande sollte demzufolge auch einen Origin besitzen.

Die für diploide D.virilis Gehirnzellen gemessene Replikationsrate von 0,35 µm x Min.$^{-1}$ (25°C) ist 2,5fach geringer als die von BLUMENFELD ET AL. (1974) in D.melanogaster Zellkulturen bestimmten 2,6 kb x Min.$^{-1}$ (0,9 µm x Min.$^{-1}$). Sie sind eher verträglich mit der Replikationsrate von 0,21 µm x Min.$^{-1}$ (ANANIEV ET AL., 1977) gleichfalls in D.melanogaster Zellkulturzellen gemessen. Die geschätzten Mittelwerte aus den Repliconlängenverteilungen der Gehirne, bzw. Speicheldrüsen von D.virilis, 35,6 µm, bzw. 46,7 µm sind gleichfalls eher mit den von ANANIEV ET AL. (1977) gemessenen 70 µm verträglich. "Clusters", wie von BLUMENTHAL ET AL. zugrunde gelegt wurden, fanden sich selten (s.a. Varianzanalysen).

Praefixierte Terminationsstellen in D.virilis

Terminationsstellen zwischen benachbarten, konvergierenden Replikationsabschnitten wurden von HUBERMAN und RIGGS (1968) postuliert. Aus Befunden über die Variation der Origin-Origin-Entfernungen in Praeblastodermkernen und Zellkulturzellen schließt BLUMENTHAL ET AL. (1974) die Existenz fixierter Termini

aus. Auch HAND (1975) konnte in den untersuchten Autoradiographien nicht das ARG-Muster, das er theoretisch als Indiz für Termini fordert, entdecken. In ABB. 34h ist eine ARG-Serie (Pfeil) abgebildet, welche diesem theoretisch geforderten Muster entspricht (s. auch III.5.1.6.).

Zu meinem Erstaunen fanden sich in dem Experiment nach Versuchsschema b - warmer Puls und nachfolgendem heißen Puls - ARG-Serien, welche sich nur durch praefixierte Terminationsstellen interpretieren lassen (ABBn. 37 und 38). Bei kontinuierlicher Propagation der Replikationsgabeln hätten die "Lücken" (gaps) innerhalb des 4stündigen zweiten Pulses längst geschlossen sein müssen. Diese abrupte, vorzeitige Beendigung der Verdopplung zeigen mehrere ARGs in Serie, und die Replikationsabschnitte, welche von ein und demselben Origin divergieren, sind teilweise verschieden lang (ABB. 38c). Sowohl ARGs, die mehrere Origins enthalten, welche von fusionierten Markierungsspuren flankiert sind, als auch ARGs, die nur einen Origin enthalten, finden sich in einer ARG-Serie (ABB. 38a, b). Das gemeinsame Vorkommen beider Formen sollte einen Artefakt ausschließen. Da die Gehirnzellen nicht synchronisiert waren, kann nicht entschieden werden, ob die Replicons "verdoppelte Lücken" enthalten oder nicht; d.h., ob die Lücken "früh" oder "spät" replizierende Abschnitte darstellen. Spät replizierende Lücken wurden für Zellkulturzellen des Chinesischen Hamsters beschrieben, welche mit dem Antibioticum Puromycin behandelt waren (HORI und LARK, 1973); ferner in Dipidomys ordii DNS-Fadenautoradiographien, welche vermutlich replizierender Satelliten-DNS entsprachen (HORI und LARK, 1974).

Selektive Überreplikation bestimmter chromosomaler Abschnitte wie z.B. die "DNS-Puffs" in Rhynchosciara (BREUER und PAVAN, 1955), die Unterreplikation der rDNS in den Speicheldrüsen von Drosophila, z.B. D.melanogaster (SPEAR und GALL, 1973), möglicherweise die Unterreplikation des α -Heterochromatins (HEITZ, 1934 und s. auch diese Arbeit) sind Phänomene, welche sich am einfachsten durch differenzierte Aktivier- bzw.

Inaktivierbarkeit von Origins, bei gleichzeitig praefixierten Termini, erklären lassen (s. auch STEINEMANN, 1978).

V. ZUSAMMENFASSUNG

Replizierende DNS in D.virilis Gehirnen und Speicheldrüsen läßt sich sehr effektiv in Organkultur markieren. Die erzielte hohe spezifische Aktivität erlaubt nach Fraktionierung der DNS in Gleichgewichts-Dichtegradienten eine DNS·DNS-Renaturierung in situ. Mit dieser Methode konnten alle drei Satellitenfraktionen im α-Heterochromatin der polytänen Speicheldrüsenkerne lokalisiert werden. Aus dem Markierungsmuster nach in situ-Renaturierung mit markierter Speicheldrüsen-DNS läßt sich ableiten, daß weitere repetitive Sequenzen gehäuft in dem β-heterochromatischen Chromozentrum vorkommen. Weder in analytischen noch in präparativen CsCl Gleichgewichts-Dichtegradienten lassen sich Satellitenfraktionen in den hochpolytänen Speicheldrüsenkernen nachweisen.

Mit der "Markierten-Mitose-Technik" wurden für eine proliferierende Zellpopulation in D.virilis Gehirnen eine S-Phasenlänge t_s = 11,9 Stdn. $\pm$ 4,3 (Mittelwert), bzw. 11,2 Stdn. (Medianwert) und eine G_2-Phasenlänge $t_{(G_2 + {}^1/_{2M})}$ = 6,9 Stdn. $\pm$ 3,8 (Mittelwert), bzw. 6,0 Stdn. (Medianwert) ermittelt. Unter der Voraussetzung, daß es sich um eine exponentiell proliferierende Zellpopulation handelt, bestimmt sich die Zellzykluslänge auf t_c = 22,9 Stdn. und für t_{G_1} ergibt sich zwangsläufig 4,1 Stdn..

Die α-heterochromatischen Hälften der mitotischen Chromosomen beginnen später als das Euchromatin mit ihrer Verdopplung. Nach einer gemeinsamen Verdopplungsphase beenden die α-Heterochromatinhälften allein den Verdopplungszyklus. Bemerkenswert ist eine Asynchronie zwischen den einzelnen Chromosomen im Abschluß der Verdopplung. Die Abfolge der Markierung in den diploiden Kernen ist: "nur Euchromatin" ($\approx$ 1 Std.), "Eu- und α-Heterochromatin" ($\approx$ 8 Stdn.) und "nur α-Heterochromatin" ($\approx$ 3 Stdn.). Für Euchromatin und α-Heterochromatin betragen demzufolge die Verdopplungszeiten $S_{Eu} \approx 9$ Stdn. und $S_H \approx 11$ Stdn..

Die Replikationszeit der DNS eines Chromosoms ist bestimmt durch die drei Determinanten: Replikationsrate, Replikonlängen und Initiationsabfolge der aktivierbaren Origins. Diese Determinanten wurden in D.virilis Gehirnen (vorwiegend diploide Zellen) und Speicheldrüsen (hochpolytäne Zellen) mit der Methode der DNS-Fadenautoradiographie bestimmt.

Die Replikationsrate der Gehirnzellen ist 0,35 µm x $Min.^{-1}$ ($25^{o}C$) und die der Speicheldrüsenzellen 0,1 µm x $Min.^{-1}$ ($25^{o}C$). Die Replikationsrate der DNS in Speicheldrüsen ist somit 3,5fach langsamer als die der DNS in den Gehirnen.

In den Gehirnen wie in den Speicheldrüsen ist die Verteilung der Repliconlängen positiv schief mit einem exzessiven positiven Auslauf. Es liegt also neben dem Hauptverteilungsbereich ein relativ breites Spektrum großer Repliconlängen geringer Anzahl vor. Die charakteristischen Größen der Repliconlängen sind: (i) Gehirne, $\tilde{x}$ = 21,0 µm (Medianwert), $\tilde{\tilde{x}}$ = 31,0 µm (um kurze "en bloc"-Replicons korrigierter Wert), $\bar{x}$ = 35,6 µm (Mittelwert), bei einer Spannbreite von 2 - 238 µm; der Medianwert der pro "Repliconklasse" verdoppelten DNS ist 61,7 µm und $^{3}/_{4}$ wird von Repliconlängen $\leq$ 88,6 µm repliziert. (ii) Speicheldrüsen, $\tilde{x}$ = 39,5 µm, $\bar{x}$ = 46,7 µm, bei einer Spannbreite von 5 - 203 µm; der Medianwert der pro "Repliconklasse" verdoppelten DNS ist 64,1 µm und $^{3}/_{4}$ wird von Repliconlängen $\leq$ 80,9 µm repliziert. Letztere sollten charakteristisch für die Phasen "kontinuierlich" einschließlich "diskontinuierlich I" sein.

Ungefähr 90% aller $\overline{P_l P_r}$-Längen (Maß für die Initiationsintervalle) in den Gehirnen und ungefähr 80% in den Speicheldrüsen gehören der Klasse 0 - 50 µm an. Unter der Berücksichtigung der jeweiligen Replikationsraten initiiert das Gros der aktiven Origins der Gehirne innerhalb 71 Min., das der Speicheldrüsen innerhalb 4,2 Stdn..

Chromosomale Markierungsmuster, diploider wie polytäner Kerne, wurden im Zusammenhang mit den drei durch DNS-Fadenautoradiographie bestimmten Determinanten der chromosomalen Verdopplung

diskutiert. Für die euchromatischen Chromosomenabschnitte ergibt sich folgender Verdopplungsablauf: Die Chromosomenverdopplung beginnt mit einer asynchronen Auftaktphase, die in eine gemeinsame Verdopplungsaktivität für das Gros der Replicons, wenn nicht aller, überleitet. Die Auftaktphase ist relativ kurz, < 15% der S-Phasenlänge. Nach ungefähr 35% der S-Phasenlänge ist $^{3}/_{4}$ der chromosomalen DNS verdoppelt. 65% der S-Phasenlänge wird mit der Verdopplung der wenigen langen Replicons ausgefüllt, die in Gruppen vorliegend für die späte Spot-Markierung verantwortlich sind ("weak points" ausgenommen). Nach dieser Interpretation müssen "Replicon-clusters" (vgl. z.B. Definition in HAND, 1978) als Konsequenz zweier Verdopplungsfaktoren aufgefaßt werden: eine Initiationsreaktion aller aktivierbaren euchromatischen Origins in begrenzter Asynchronie und einer gleichzeitigen Tendenz zu einer nach Peplicongrößen gruppierten Anordnung der Replicons; d.h. "Repliconclusters" sind vor allem zusammenliegende längere Replicons.

Zur Analyse der Verdopplung des α-Heterochromatins, bzw. der Satellitensequenzen, wurde der biologische Unterschied zwischen den polytänen Speicheldrüsenzellen in denen α-Heterochromatin praktisch fehlt und den diploiden Gehirnzellen ausgenutzt. Zwei Typen von Autoradiographien fanden sich ausschließlich bzw. fast ausschließlich in Gehirnzellen: Der erste Typ ist eine diffuse, unregelmäßige Markierung, die als dichte Abfolge von Origins interpretierbar ist, die in Gruppen aktiviert zu werden scheinen. Der zweite Typ ist durch sehr kurze Replicons gekennzeichnet (< 10 µm), die über lange Distanzen en bloc replizieren. Mit diesen Markierungsmustern lassen sich allerdings der späte Beginn und die lange Replikationsdauer des α-Heterochromatins nicht erklären. Es wird angenommen, daß die besonders dichte Abpackung des α-Heterochromatins für die beobachteten Replikationsmuster verantwortlich ist.

Ein möglicher Zusammenhang zwischen den Distanzen aktiver Origins (Repliconlängen) und der Chromatinstruktur - Eu-

chromatin und α-Heterochromatin, Banden und Interbanden (Chromomeren und Interchromomeren) - wird diskutiert. Bei einer angenommenen unteren Bandenzahl von 2000 und einer oberen von 5000 läßt sich aus dem haploiden euchromatischen Anteil des D.virilis Genoms eine maximale DNS-Länge von 34 µm, bzw. eine minimale von 13,6 µm pro Chromomer und Chromatide errechnen. Bei einem Mittelwert der Replicon-längen (Speicheldrüsen) von 46,7 µm würde im Durchschnitt ein Replicon 1,4 - 3,4 Chromomeren entsprechen. Ferner kristallisierte sich aus der vergleichenden Diskussion der hier dargelegten Befunde mit den Verdopplungseigenschaften der Praeblastodermkerne eine mögliche Beteiligung eines Histons (H1?) an der Aktivierbarkeit, bzw. Inaktivierung von Origins heraus.

ARG-Serien von D.virilis Gehirnen, nach dem Versuchsschema: warmer Puls - heißer Puls markiert, lassen sich nur durch Postulierung praefixierter Termini erklären.

VI. LITERATUR

ADKISSON, K.P., PEPREAULT, W.J., GAY, H.: Differential fluorescent staining of Drosophila chromosomes with quinacrine mustard. Chromosoma (Berl.) 34, 190-205 (1971)

ANANIEV, E.V., POLUKAROVA, L.G., YUROV, Y.B.: Replication of chromosomal DNA in diploid Drosophila melanogster cells cultured in vitro. Chromosoma (Berl.) 59, 259-272 (1977)

ARCOS-TERÁN, L.: DNS-Replikation und die Natur der spät replizierenden Orte im X-Chromosom von Drosophila melanogaster. Chromosoma (Berl.) 37, 233-296 (1972)

ATHERTON, D., GALL, J.G.: Salivary gland squashes for in situ nuclecic acid hybridization studies. Dros. Inf. Serv. 49, 131-133 (1972)

BEERMANN, W.: Riesenchromosomen, Protoplasmatologia VI D.Wien: Springer 1962

BEERMANN, W.: Chromomeres and genes. In: Results and problems in cell differentiation. Vol. 4 (W. Beermann, J. Peinert, H. Ursprung, eds.) S. 1-33. Berlin-Heidelberg-New York: Springer Verlag 1972

BLAMIRE, J., CRYER, D.R., FINKELSTEIN, D.B., MARMUR, J.: Sedimentation properties of yeast nuclear and mitochondrial DNA. J. molec. Biol. 67, 11-24 (1972)

BLUMENFELD, M., ORF, J.W., SINA, B.J., KREBER, R.A., CALLAHAN, M.A., MULLINS, J.J., SNYDER, L.A.: Correlation between phosphorylated H1 histones and satellite DNAs in Drosophila virilis. Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 75, 866-870 (1978)

BLUMENTHAL, A.B., KRIEGSTEIN, H.J., HOGNESS, D.S.: The units of DNA replication in Drosophila melanogaster chromosomes. In: Cold. Spr. Harb. Symp. quant. Biol. 38, 205-224 (1974)

BODENSTEIN, D.: The postembryonic development of Drosophila. In: Biology of Drosophila (M. Demerec, ed.) S. 275-364. New York: John Wiley and sons, Inc. 1950

BORUN, T.W.: Histones, differentiation, and the cell cycle. In: Results and problems in cell differentiation. Vol.7 (J. Reinert and H. Holtzer eds.) S. 249-290. New York: Springer Verlag 1975

BREUER, M.E., PAVAN, C.: Behavior of polytene chromosomes of Rhynchosciara angelae at different stages of larval development. Chromosoma (Berl.) 7, 371-386 (1955)

BRIDGES, C.B.: Salivary chromosome maps. J. Hered. 26, 60-64 (1935)

CAIRNS, J.: Autoradiography of Hela cell DNA. J. molec. Biol. 15, 372-373 (1966)

CALLAN, H.C.: Replication of DNA in the chromosomes of eukaryotes. Proc. R. Soc. Lond. B. 181, 19-41 (1972)

CHUN, E.H.L.: The separation of the light and heavy strands of bromouracil - substituted mammalian DNA. J. molec. Biol. 3, 668-673 (1961)

CLAVIEZ, M.: Vergleich verschiedener Präparationsmethoden zur Oberflächendarstellung von RNS-Tumorviren und der sie produzierenden Zellen im Transmissions- und Raster-Elektronenmikroskop. Diplomarbeit, Universität Tübingen (1976)

COHEN, L.H., GOTCHEL, B.V.: Histones of polytene and nonpolytene nuclei of Drosophila melanogaster. J. biol. Chem. 246, 1841-1848 (1971)

DION, A.S., HERBST, E.J.: Polyamine changes during development of Drosophila melanogaster. Ann. N.Y. Acad. Sci. 171, 723-734 (1970)

DOLFINI, S., COURGEON, A.M., TIEPOLO, L.: The cell cycle of an established line of Drosophila melanogaster cells in vitro. Experientia (Basel) 26, 1020-1021 (1970)

EDENBERG, J.H., HUBERMAN, J.A.: Eukaryotic chromosome replication. In: Annual Review of Genetics (H.L. ROMAN, A. CAMPBELL, L.M. SANDLER, eds.) 9, 245-284 (1975)

ELGIN, S.C.R., WEINTRAUB, H.: Chromosomal proteins and chromatin structure. Ann. Rev. Biochem. 44, 725-774 (1975)

ENDOW, S.A., GALL, J.G.: Differential replication of satellite DNA in polyploid tissues of Drosophila virilis. Chromosoma (Berl.) 50, 175-192 (1975)

ERIKSON, R.L., SZYBALSKI, W.: The Cs_2SO_4 equilibrium density gradient and its application for the study of T-even phage DNA: glucosylation and replication. Virology 22, 111-124 (1964)

FLAMM, W.G., McCALLUM, M., WALKER, P.M.B.: The isolation of complementary strands from a mouse DNA fraction. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 57, 1729-1734 (1967)

GABRUSEWYCZ-GARCIA, N.: Cytological and autoradiographic studies in Sciara coprophila salivary gland chromosomes. Chromosoma (Berl.) 15, 312-344 (1964)

GALL, J.G., COHEN, E.H., POLAN, M.L.: Repetitive DNA sequences in Drosophila. Chromosoma (Berl.) 33, 319-344 (1971)

GALL, J.G., ATHERTON, D.: Satellite DNA sequences in Drosophila virilis. J. molec. Biol. 85, 633-664 (1974)

GILES, K.W., MYERS, A.: An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. Nature (Lond.) 206, 93 (1965)

GROSSCHEDL, R., HOBOM, G.: DNA sequences and structural homologies of the replication origins of lambdoid bacteriophages. Nature 277, 621-627 (1979)

HACKETT, P., HANAWALT, P.: Selectivity for thymine over 5-bromouracil by a thymine-requiring bacterium. Biochim. et Biophys. Acta 123, 356-363 (1966)

HÄGELE, K.: Komplementäre DNA-Replikationsmuster bei Drosophila melanogaster. Chromosoma (Berl.) 41, 231-236 (1973)

HÄGELE, K.: DNS-Replikationsmuster der Speicheldrüsen-Chromosomen von Chironomiden. Chromosoma (Berl.) 31, 91-138 (1970)

HALD, A.: Statistical theory with engineering applications. New York, London: J. Wiley 1952

HAND, R.: Eucaryotic DNA: Organization of the genome for replication. Cell 15, 317-325 (1978)

HAND, R.: Regulation of DNA replication on subchromosomal units of mammalian cells. J. Cell. Biol. 64, 89-97 (1975)

HEIDELBERGER, C.: Fluorinated Pyrimidines. Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol., 4, 1-50 (1965)

HEITZ, E.: Über α- und β-Heterochromatin sowie Konstanz und Bau der Chromomeren bei Drosophila. Biol. Zbl. 54, 588-609 (1934)

HOLMQUIST, C.: Hoechst 33 258 fluorescent staining of Drosophila chromosomes. Chromosoma (Berl.) 49, 333-356 (1975)

HORI, T., LARK, K.G.: Effect of puromycin on DNA replication in Chinese hamster cells. J. molec. Biol. 77, 391-404 (1973)

HORI, T., LARK, K.G.: Autoradiographic studies of the replication of satellite DNA in the kangaroo rat. Autoradiography of satellite DNA. J. molec. Biol. 88, 221-232 (1974)

HOUSMAN, D., HUBERMAN, J.A.: Changes in the rate of DNA fork movement during S Phase in mammalian cells. J. molec. Biol. 94, 173-181 (1975)

HOWARD, A., PELC, S.R.: Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. In: 'Symposium on chromosome Breakage'. Heredity, 6, Oliver and Boyd (1953)

HOZIER, J., NEHLS, P., RENZ, M.: The chromosome fiber: Evidence for an orderd superstructure of nucleosomes. Chromosoma (Berl.) 62, 301-317 (1977)

HUBERMAN, J.A., RIGGS, A.D.: On the mechanism of DNA replication in mammalian chromosomes. J. molec. Biol. 32, 327-341 (1968)

HUBERMAN, J.A., TSAI, A.: Direction of DNA replication in mammalien cells. J. molec. Biol. 75, 5-12 (1973)

JACOB, F., BRENNER, S.: Sur la régulation de la synthèse du DNA chez les bactéries: l'hypothèse du réplicon. C.R. Acad. Sci. Paris 256, 298-300 (1963)

JAMRICH, M., GREENLEAF, A.L., BAUTZ, K.K.F.: Localization of RNA polymerase in polytene chromosomes of Drosophila melanogaster. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 2079-2083 (1977)

KAUFMANN, B.P., GAY, H., BUCHANAN, J., WEINGART, A., MARUYAMA, K., AKEY, A.: Organization of cellular materials. Carnegie Inst. Wash. Yearbook 61, 466-474 (1962)

KAVENOFF, R., ZIMM, B.H.: Chromosome - sized DNA molecules from Drosophila. Chromosoma 41, 1-27 (1973)

KAVENOFF, R., KLOTZ, L.C., ZIMM, B.H.: On the nature of chromosome - sized DNA molecules. In: Cold. Spr. Harb. Symp. quant. Biol. 38, 1-8 (1974)

KEYL, H.-G., PELLING, C.: Differentielle DNS Replikation in den Speicheldrüsen - Chromosomen von Chironomus thummi. Chromosoma (Berl.) 14, 347-359 (1963)

KORNBERG, R.D.: Chromatin structure: A repeating unit of histones and DNA. Science 184, 868-871 (1974)

KRIEGSTEIN, H.J., HOGNESS, D.: Mechanism of DNA replication in Drosophila chromosomes: structure of replication forks and evidence for bidirectionality. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 135-139 (1974)

LARK, K.G., CONSIGLI, R., TOLIVER, A.: DNA replication in Chinese hamster cells: Evidence for a single replication fork per replicon. J. molec. Biol. 58, 873-875 (1971)

LILLIE, R.D.: Histopathologie Technic and Practical Histochemistry In: Staining Procedures, ed. 3, (McGraw Hill, ed.) New York: Williams and Wilkins CO. Baltimore 1973

LIMA-DE-FARIA, A.: Differential uptake of tritiated thymidine into hetero-and euchromatin in Melanoplus and Secale. J. Biophys. Biochem. Cytol. 6, 457-466 (1959)

LIMA-DE-Faria, A.: Initiation of DNA synthesis at specific segments in the meiotic chromosomes of Melanoplus. Hereditas 47, 674-694 (1961)

MAHOWALD, A.P.: Polar granules of Drosophila II. Ultrastructural changes during embryogenesis. J. exp. Zool. 167, 237-261 (1968)

MAKINO, S.: A morphological study of the nuclei in various kinds of somatic cells of Drosophila virilis. Cytologia 9, 272-282 (1938)

McFARLANE, P.W., CALLAN, H.G.: DNA replication in the chromosomes of the chicken, Gallus domesticus. J. Cell. Sci. 13, 821-839 (1973)

OPARA-KUBINSKA, Z., BOROWSKA, Z., SZYBALSKI, W.: Genetic transformation studies. III. Effect of UV light on the molecular properties of normal and halogenated DNA. Biochim. Biophys. Acta 72, 298-309 (1963)

PAINTER, R.B., SCHAETER, A.W.: Variation in the rate of DNA chain growth through the S phase in Hela cells. J. molec. Biol. 58, 289-295 (1971)

PARDUE, M.L., GALL, J.G.: Nucleic acid hybridization to the DNA of cytological preparations. In: Methods in cell Biology Vol. 10 (D.M. Prescott ed.), S. 1-16. New York - San Francisco - London: Academic Press 1975

PEACOCK, W.J., BRUTLAG, D., GOLDRING, E., APPELS, R., HINTON, C.W., LINDSLEY, D.L.: The organization of highly repeated DNA sequences in Drosophila melanogaster Chromosomes. In: Cold. Spr. Harb. Symp. quant. Biol. 38, 405-416 (1974)

PEDERSON, T.: Cellular aspects of histone synthesis. In: Protein Synthesis, Vol.2 (E.H. McConkey, ed.) S. 69-123. New York: Marcel Dekker 1976

PELLING, C.: A replicative and synthetic chromosomal unit - the modern concept of the chromomere. Proceedings of the Royal Society, B 164, 279-289 (1966)

PETES, T.D., FANGMAN, W.L.: Sedimentation properties of yeast chromosomal DNA. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 1188-1191 (1973)

PETTIJOHN, D., HANAWALT, P.: Evidence for repair replication of ultraviolet damaged DNA in bacteria. J. molec. Biol. 9, 395-410 (1964)

PLAUT, W.: On the replicative Organization of DNA in the polytene chromosome of Drosophila melanogaster. J. molec. Biol. 7, 632-635 (1963)

PLAUT, W., NASH, D., FANNING, T.: Ordered replication of DNA in polytene chromosomes of Drosophila melanogaster. J. molec. Biol. 16, 85-93 (1966)

QUASTLER, H., SHERMAN, F.G.: Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse. Experim. Cell Research 17, 420-438 (1959)

RABINOWITZ, M.: Studies on the cytology and early embryology of the egg of Drosophila melanogaster. J. Morphol. 69, 1-49 (1941a)

RUDKIN, G.T.: Cytochemistry in the ultraviolet. Microchem. J. Symp. Ser. 1, 261-276 (1961)

RUDKIN, G.T.: The relative mutabilities of DNA in regions of the X Chromosome of Drosophila melanogaster. Genetics 52, 665-681 (1965)

RUDKIN, G.T.: Non replicating DNA in Drosophila. Genetics Suppl. 61, 227-238 (1969)

RUDKIN, G.T.: Replication in polytene chromosomes. In: Results and problems in cell differentiation. Vol.4 (W.Beermann, J.Reinert, H.Ursprung, eds.) S. 59-85. Berlin-Heidelberg-New York: Springer Verlag 1972

SACHS, L.: Angewandte Statistik. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag 1978

SADGOPAL, A., BONNER, J.: The relationship between histone and DNA synthesis in Hela cells. Biochem. Biophys. Acta 186, 349-357 (1969)

SCHMID, C.W., MANNING, J.E., DAVIDSON, N.: Inverted repeat sequences in the Drosophila genome. Cell 5, 159-172 (1975)

SIMON, E.H.: Transfer of DNA from parent to progeny in a tissue culture line of human carcinoma of the cervix (strain Hela). J. molec. Biol. 3, 101-109 (1961)

SLIZYNSKI, B.M.: "Ectopic" pairing and the distribution of heterochromatin in the X-Chromosome of salivary gland nuclei of Drosophila melanogaster. Proc. roy. Soc. Edinb. 82, 114-119 (1945)

SPEAR, B.B., GALL, J.G.: Independent control of ribosomal gene replication in polytene chromosomes of D. melanogaster. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 70, 1359-1363 (1973)

STEINEMANN, M.: The in situ formation of DNA•DNA duplexes of Drosophila virilis satellite DNA. Chromosoma (Berl.) 54, 339-348 (1976)

STEINEMANN, M.: Co-replication of satellite DNA of Chironomus melanotus with mainband DNA during polytenization. Chromosoma (Berl.) 66, 127-139 (1978)

STUBBLEFIELD, E., MUELLER, G.C.: Molecular events in the reproduction of animal cells. II. The focalized synthesis of DNA in the chromosomes of Hela cells. Cancer Res. 22, 1091-1099 (1962)

TAYLOR, J.H.: Asynchronous duplication of chromosomes in cultured cells Chinese hamster. J. Biophys. Biochem. Cytol. 7, 455-464 (1960)

VINOGRAD, J., MORRIS, J., DAVIDSON, N., DOVE, W.F., Jr.: The buoyant behavior of viral and bacterial DNA in alkaline CsCl. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 49, 12-17 (1963)

WEINTRAUB, H.: A possible role for histones in the synthesis of DNA. Nature, 240, 449-453 (1972)

WEISBLUM, B.: Fluorescent probes of chromosomal DNA structure: three classes of acridines. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. 38, 441-449 (1973)

ZAKIAN, V.A.: Electron microscopic analysis of DNA replication in main band and satellite DNAs of Drosophila virilis. J. molec. Biol. 108, 305-331 (1976)

ZALOKAR, M., ERK, J.: Division and migration of nuclei during early embryogenesis of Drosophila melanogaster. J. Microscopie Biol. Cell. 25, 97-106 (1976)

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

DNS	Desoxyribonucleinsäure
RNS	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
dThd	Thymidin
dUMP	Desoxyuridinmonophosphat
dTMP	Desoxythymidinmonophosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BrdUrd	5-Brom-2'-desoxyuridin
FdUrd	5-Fluor-2'-Desoxyuridin
dA•dT	basengepaartes Desoxyadenosin mit Thymidin
H	schwerer DNS-Einzelstrang
L	leichter DNS-Einzelstrang
TCE	Trichloressigsäure
EDTA	Äthylentetraessigsäure
SSC	0,15 M NaCl - 0,015 M Natriumcitrat (pH 7,0)
Upm	Umdrehungen pro Minute
cpm	Impulse pro Minute
dpm	Zerfälle pro Minute
M.I.	Markierungsindex
t_c	Zellzykluslänge
t_s	S-Phasenlänge
t_{G_1}	G_1-Phasenlänge
$t_{(G2+^1/2M)}$	$(G_2+^1/2M)$-Phasenlänge

n_{M^*H}	Anzahl der nur im α-Heterochromatin markierten Metaphasen
n_{M^*E}	Anzahl der nur im Euchromatin markierten Metaphasen
n_{M^*E+H}	Anzahl der im Eu- und Heterochromatin markierten Metaphasen
ARG	Autoradiogramm
O.-O.	Origin-Origin-Entfernung
T	Terminus (praefixiert)
T^*	Terminus (Fusionspunkt konvergierender RAs)
RA	Replikationsabschnitt
RG	Replikationsgabel
v_{RG}	Wachstumsrate der Replikationsgabel
RL	mittlere Länge der Markierungsspuren eines heißen Pulses definierter Zeitdauer
P_l	Einsatzpunkt der Pulsmarkierung links vom Origin
P_r	Einsatzpunkt der Pulsmarkierung rechts vom Origin
$\overline{P_l P_r}$	Entfernung zwischen den Einsatzpunkten der Pulsmarkierung
$\tilde{x}$	Medianwert
$\bar{x}$	Mittelwert
$\hat{F}$	Varianzverhältnis
χ^2	Chi-Quadrat
E.coli	Escherichia coli
B.subtilis	Bacillus subtilis

L E B E N S L A U F

STEINEMANN, Manfred; geboren am 3.10.1943 in Heubach als zweites Kind von Alfred STEINEMANN und seiner Ehefrau Emilie, geb. FUCHS.

1964: Abitur

1964 - 1971: Studium der Biologie, Chemie und Sportwissenschaft an den Universitäten Tübingen und München;

Vordiplom in Biologie (Universität Tübingen); Staatsexamen in Biologie und Sportwissenschaft (Universität Tübingen).

1972 - 1979: Dissertation bei Prof. Dr. W. Beermann am Max-Planck-Institut für Biologie über: "Untersuchungen zur chromosomalen DNS-Verdopplung in Drosophila".

Veröffentlichungen:

STEINEMANN, M.: The in situ formation of DNA•DNA duplexes of Drosophila virilis satellite DNA. Chromosoma (Berl.) 54, 339-348 (1976)

STEINEMANN, M.: Co-replication of satellite DNA in Chironomus melanotus with mainband DNA during polytenization. Chromosoma (Berl.) 66, 127-139 (1978)

Meine akademischen Lehrer waren:

AUTRUM	MÄGDEFRAU
BEERMANN	METZNER
BÜNNING	MÖHRES
v. DEHN	MÜLLER
GRELL	RÜDORFF
GRUPE	SCHWEIZER
KRÜGER	SEYFFERT